

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



**Sensibilidad frente a los antipalúdicos y
variabilidad genética del *Plasmodium
falciparum* en Guinea Ecuatorial**

**Tesis doctoral presentada por:
Ana Guerra Neira**

INDICE

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HISTORIA DEL PALUDISMO	1
1.2. PALUDISMO Y CICLO BIOLÓGICO	2
1.3. EL PALUDISMO EN EL MUNDO	4
1.4. ANTIPALÚDICOS	5
1.4.1. MEDICAMENTOS DISPONIBLES PARA EL TRATAMIENTO DEL PALUDISMO	5
1.4.2. RESISTENCIA A LOS ANTIPALÚDICOS	6
1.4.3. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE LAS RESISTENCIAS	8
1.5. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR EN PALUDISMO	9
1.5.1. MARCADORES MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE POBLACIONES DE <i>P. falciparum</i> .	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. ESTUDIOS DE EFICACIA TERAPÉUTICA <i>IN VIVO</i>	14
2.1.1. ÁREA Y POBLACIÓN A ESTUDIO	14
2.1.2. MUESTREO Y SELECCIÓN DE LOS PACIENTES	15
2.1.3. TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES	17
2.2. ESTUDIO MOLECULAR DEL MATERIAL BIOLÓGICO	19
2.2.1. EXTRACCIÓN DE DNA	19
2.2.2. ESTUDIO MEDIANTE PCR DE LA VARIABILIDAD DE LOS GENES <i>msp-1</i> Y <i>msp-2</i>	19
2.3. ANÁLISIS DE DATOS Y DEFINICIONES	23
3. OBJETIVOS	25
4. RESULTADOS	26
4.1. ESTUDIOS IN VIVO DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA A DIFERENTES ANTIPALÚDICOS	26
4.1.1. ESTUDIO DE EFICACIA TERAPÉUTICA REALIZADO EN EL AÑO 1999	26
4.1.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS NIÑOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	26
4.1.1.2. EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN TRAS EL TRATAMIENTO	28

4.1.2.	ESTUDIO DE EFICACIA TERAPÉUTICA REALIZADO EN EL AÑO 2001	30
4.1.2.1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS NIÑOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	30
4.1.2.2.	EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN TRAS EL TRATAMIENTO	33
4.1.3.	ESTUDIO DE EFICACIA TERAPÉUTICA REALIZADO EN EL AÑO 2002	36
4.1.3.1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS NIÑOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	36
4.1.3.2.	EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN TRAS EL TRATAMIENTO	38
4.2.	ESTUDIO DE LOS GENES <i>msp-1</i> Y <i>msp-2</i> DE <i>Plasmodium falciparum</i>	40
4.2.1.	DIFERENCIACIÓN ENTRE RECAÍDAS Y NUEVAS INFECCIONES	40
4.2.2.	MULTIPLICIDAD	45
4.2.3.	VARIABILIDAD GENÉTICA	51
5.	DISCUSIÓN	58
6.	CONCLUSIONES	77
7.	BIBLIOGRAFÍA	78

1. INTRODUCCIÓN

El paludismo ha sido reconocido como una de las grandes enfermedades crónicas de la humanidad siendo una de las enfermedades más antiguas conocida por el hombre. Su importancia es tal que llega a condicionar el desarrollo económico, especialmente de los países tropicales y subtropicales.

1.1. HISTORIA DEL PALUDISMO

Se piensa que el paludismo se originó en África, siguiendo una evolución paralela a la del hombre. Hipócrates fue el primero en describir las manifestaciones de la enfermedad y relacionarla con un periodo del año determinado y con ciertas zonas donde vivían los pacientes, aunque las primeras referencias a la enfermedad documentadas datan del 2700 a.C. del emperador chino Huang Ti. Parece indudable el papel del paludismo como factor determinante de la historia de Grecia y Roma (Jones, 1907), siendo posiblemente la causa de muerte de Alejandro Magno. Las primeras campañas contra el paludismo se llevaron a cabo en Roma, consistieron en el drenaje de aguas estancadas.

A pesar de lo temprano del conocimiento de la enfermedad los descubrimientos científicos sobre el paludismo, decisivos para combatir la enfermedad, no se produjeron hasta finales del siglo XIX. El agente causal, el plasmodio, fue identificado por primera vez por Laveran (1880), ganando el Premio Nobel en 1907. La identificación del agente transmisor, la hembra del mosquito *Anopheles sp* se realizó al mismo tiempo por Sir Ronald Ross (1897) y por Giovanni Battista Grass y Amico Bigmani. Por ello sólo Ronald Ross ganó el Premio Nobel en 1902.

En un inicio el único medicamento utilizado para el paludismo era la quinina, conocida en Europa desde el siglo XVII, gracias a los misioneros jesuitas del Perú y a la condesa de Chinchón que la trajeron de América. En 1934 se sintetizó la cloroquina en Alemania bajo el nombre de Resochín®.

A partir de estos descubrimientos, a lo largo del siglo XX se pensó que la enfermedad podría ser erradicada. El descubrimiento de insecticida DDT y su utilización masiva, así como cambios en la naturaleza (desección de pantanos, etc), la utilización de telas mosquiteras y de medicamentos eficaces y baratos como la cloroquina, dieron muy buenos resultados, erradicándose en toda Europa y América del Norte, aunque en 1980 la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó a los países que habían erradicado el paludismo que mantuvieran al menos una unidad de vigilancia. A pesar de este éxito inicial en determinadas áreas, fue un gran fracaso en un gran número de países, debido a la epidemiología del paludismo. A principios de los años 70 la situación del paludismo se empezó a deteriorar al reducirse las medidas de control y mantenerse o empeorar la situación social y política de algunos países. En 1989 la OMS declaró el control del paludismo como una prioridad global debido al el empeoramiento de la situación y en 1993 se urgió a los miembros de la Asamblea a que incrementasen los esfuerzos para el control.

En el curso de los últimos quince años el paludismo se ha agravado y en estos momentos 2.400 millones de personas, es decir cerca del 45 por ciento de la población mundial, viven en más de cien países donde se puede transmitir el paludismo, siendo África el continente más afectada por la enfermedad. Es una de las principales causas de muerte de la humanidad, especialmente en niños menores de cinco años. Según

algunos especialistas, las condiciones socioeconómicas y sanitarias, las guerras y la resistencia de los vectores a los insecticidas y del parásito a la medicación complican más la erradicación. La OMS deja de lado el término erradicación para hablar de control, afirmando que existen posibilidades de intervención eficaces para ello, como el uso de mosquiteras impregnadas de insecticida o rociamientos intra o extra domiciliarios de insecticidas, el diagnóstico rápido, adecuado y de calidad. La progresiva resistencia a los fármacos antipalúdicos representa, en estos momentos, una grave amenaza para un tratamiento eficaz de la enfermedad, siendo la búsqueda de una vacuna eficaz el principal desafío de la lucha contra el paludismo. A esta situación se le une la resistencia a insecticidas que comienza a presentar el vector del paludismo.

Existen una serie de factores sociales, las guerras o los movimientos poblacionales sin control, que pueden favorecer la difusión del paludismo. Su cese es muy importante para poder controlar la enfermedad. Otra cuestión básica para explicar la evolución del paludismo, por lo tanto también para solucionarlo, es lo que aparece bajo el epígrafe de agresiones medioambientales. De este modo, el aumento de la densidad humana y sus modelos de asentamiento favorecen en algunos casos la generación de espacios para la reproducción de los vectores, haciendo que el problema no sólo persista sino que se dificulte su control.

Por otro lado, la debilidad de los sistemas de salud y la falta de participación de la comunidad en aquellos países con alta endemicidad palúdica, son parte del problema del control del paludismo. Su fortalecimiento, especialmente de los sistemas de salud nacionales y locales, es esencial, según los organismos internacionales, para conseguir el éxito en la lucha antipalúdica. En este sentido, tal como se pudo demostrar en el pasado, las iniciativas guiadas desde el exterior sin pasar por aquellos no son ni viables ni útiles para el combate antipalúdico ni para el desarrollo de la salud en general.

Por último, quizás convenga hacer una advertencia sobre el reto que para la sociedad supone la imparable globalización exponiéndola al retorno de viejas epidemias o a la emergencia de otras nuevas. Ese proceso comporta el tránsito sin fin de conocimientos, de mercancías y de personas, pero también de los microorganismos que generan las enfermedades infecciosas. Para que la lucha contra el paludismo llegue a ser efectiva tendrá que tener en cuenta este marco general y deberá procurar oportunidades justas a toda la población del planeta.

1.2. PALUDISMO Y CICLO BIOLÓGICO

El paludismo es una enfermedad causada por protozoos parásitos del género *Plasmodium* (Marchiafava y Celli, 1885). El hombre se ve afectado por cuatro especies: *Plasmodium (P.) falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium (P.) vivax* (Grassi y Feletti, 1890), *Plasmodium (P.) ovale* (Stephens, 1922) y *Plasmodium (P.) malariae* (Laveran, 1881). Las cuatro especies de plasmodios difieren morfológicamente, inmunológicamente, en su distribución geográfica, en su patrón de recaídas y en la respuesta a los antipalúdicos. Sin embargo van a realizar esencialmente el mismo tipo de ciclo: asexual en el hospedador humano y sexual en el hospedador definitivo (algunas hembras del género *Anopheles*).

Ciclo biológico del parásito:

La hembra del mosquito introduce tras su picadura los esporozoitos. Éstos, una vez en el torrente circulatorio, llegan en poco tiempo (30-40 minutos) al hígado. El ciclo lo podemos dividir en tres fases:

- **Fase hepática:** El esporozoito penetra en el hepatocito realizando en su interior una división asexual denominada esquizogonia formando el esquizonte, con un número predeterminado de merozoítos para cada especie. El esquizonte cuando alcanza la madurez rompe la célula hepática liberándolos, pasando a la circulación general. Hay dos especies, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale*, cuya esquizogonia se ralentiza haciéndose asincrónica, de tal manera que quedan en el hígado esquizontes en estado latente (hipnozoitos). La reactivación de éstos es la causante de las denominadas recidivas clínicas. En el caso de estas dos especies, además del tratamiento de los parásitos en sangre, se requiere el tratamiento dirigido contra las fases hepáticas.

- **Fase hemática:** Los merozoitos liberados desde el hepatocito penetran en los glóbulos rojos desarrollando en su interior el trofozoíto. El trofozoíto va madurando y creciendo hasta dividirse por medio de la esquizogonia hemática, lo que forma un esquizonte (el número de merozoitos por esquizonte varía para cada especie). Una vez maduro, el esquizonte se rompe liberando los merozoítos a la circulación general, pudiendo invadir nuevos eritrocitos y así producir un ciclo continuo. Esta fase hemática es la que causa la sintomatología típica del paludismo. Algunos merozoitos están predeterminados genéticamente para desarrollarse como formas sexuales o gametocitos (macrogametocito o gametocito femenino y microgametocito o gametocito masculino).

- **Esporogonia:** Corresponde a la fase sexual. Cuando una hembra de anofeles pica a un hombre infectado ingiere la sangre parasitada. Todas las formas parasitarias menos los gametocitos son destruidas en el estómago del mosquito. Aquí los microgametocitos van a sufrir un proceso que se denomina exflagelación, produciéndose los gametos. Posteriormente se produce la fecundación del macrogameto por el microgameto formando el cigoto, única etapa diploide del parásito. Éste va a dar paso a un oocineto móvil, que penetra en el epitelio que reviste el estómago del mosquito quedándose en el tejido conectivo para diferenciarse en ooquiste. En éste se produce la reducción y división nuclear y citoplasmática dando lugar a esporozoitos haploides. Cuando el ooquiste alcanza la madurez se rompe liberando los esporozoitos, que salen al hemocele y se reparten por todo el mosquito. Tienen un especial tropismo por las glándulas salivales del mismo, quedando en su interior, de tal manera que esa hembra los inoculará en una nueva picadura (Figura 1).

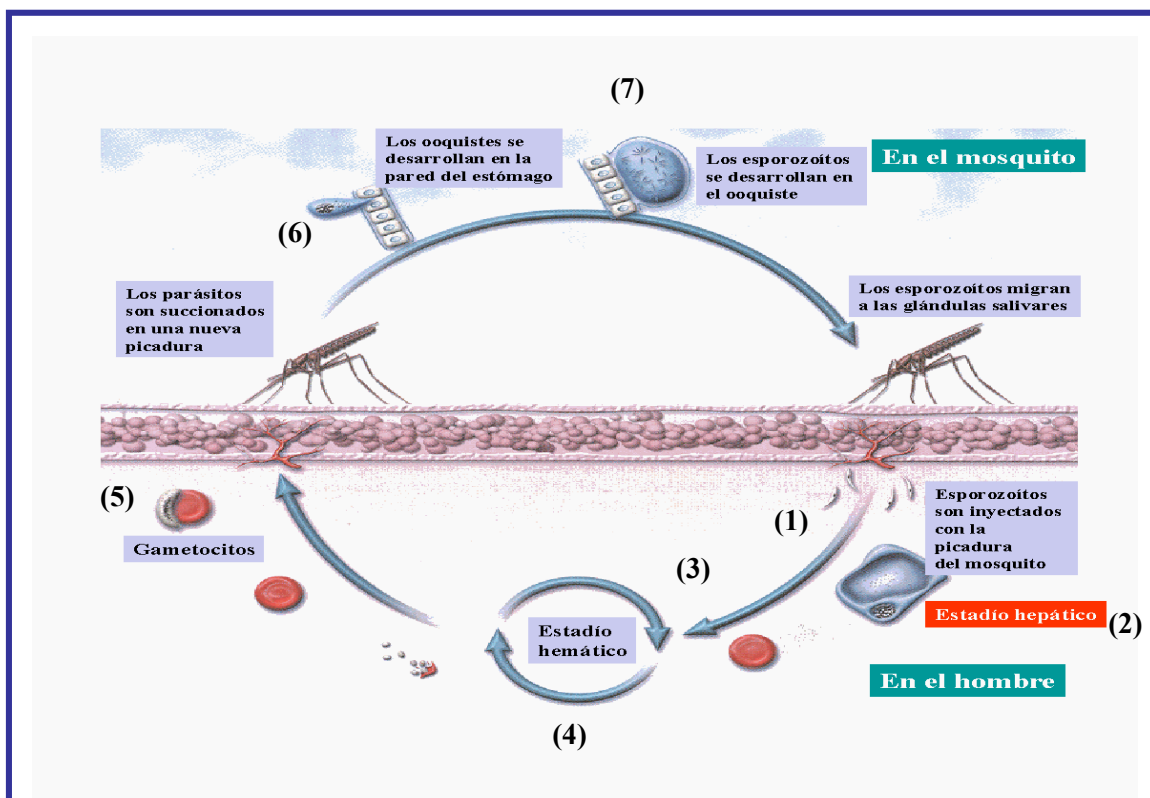


Figura 1.- Ciclo biológico del parásito dentro del hospedador definitivo (mosquito) y dentro del hospedador intermediario (hombre). (1) El mosquito introduce tras la picadura los esporozoítos. (2) Esquizogonia hepática. (3) La célula hepática se rompe, se liberan los merozoítos que pasan a la circulación general. (4) Esquizogonia hemática. (5) Formación de los gametocitos. (6) El ooquiste se introduce en la pared del estómago del mosquito. (7) Formación de los esporozoítos.

1.3. EL PALUDISMO EN EL MUNDO

En la actualidad se considera que cerca de 100 países o territorios del mundo se encuentran afectados por el paludismo. Casi la mitad de ellos se encuentran en el África Subsahariana. Aunque esta cifra es considerablemente inferior a la que había a mediados de los años cincuenta (140 países o territorios), más de 2.400 millones de personas en el mundo aún viven en áreas de riesgo.

Se calcula que la incidencia del paludismo en el mundo oscila entre 300 y 500 millones de casos clínicos cada año. El 90% de ellos suceden en África Subsahariana, la mayoría producidos por *Plasmodium falciparum*. Se estima que el paludismo le cuesta a África más de 12 billones de dólares al año.

Se cree que el paludismo causa entre 1,1 a 1,3 millones de defunciones al año, la mayoría de las cuales corresponde a niños menores de 5 años en África. Estas muertes infantiles, ocasionadas fundamentalmente por la anemia y el paludismo cerebral, representan cerca del 25% de la mortalidad africana en esta franja de edad (WHO, 2000) (Figura 2). Otros grupos de riesgo incluirían a las mujeres embarazadas, los viajeros no inmunes, personas desplazadas o trabajadores que entran en áreas endémicas.

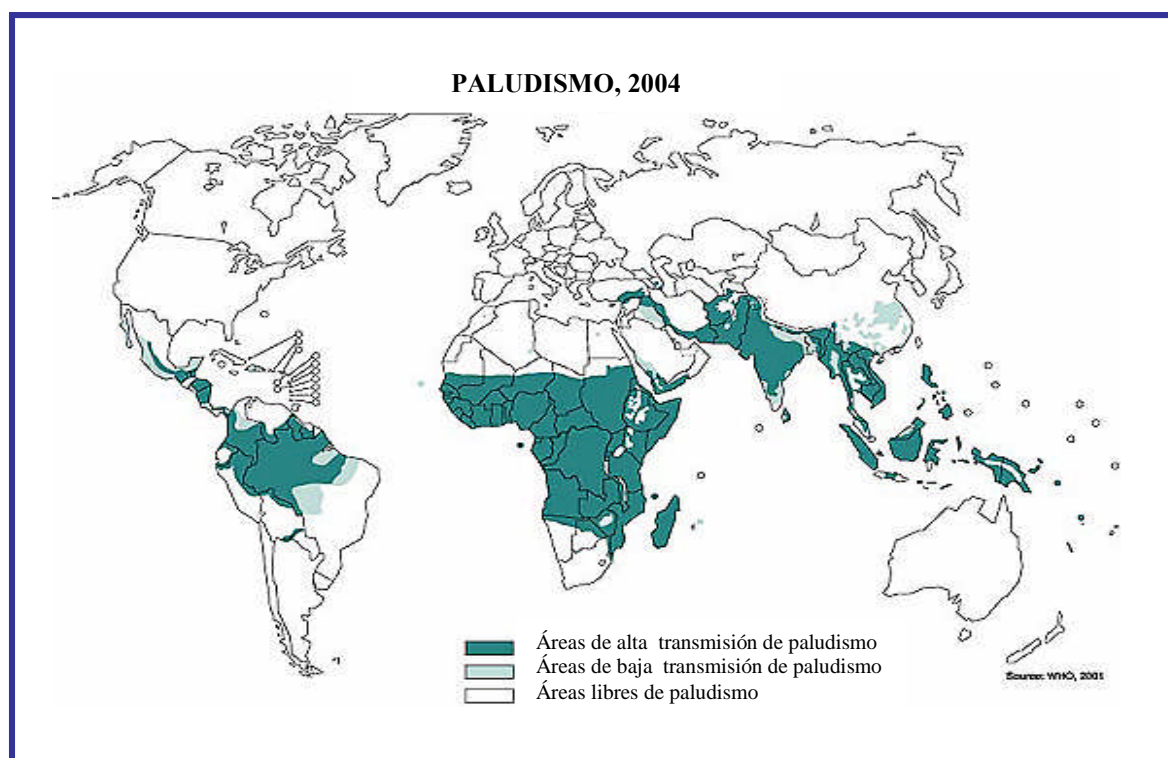


Figura 2.- Zonas de transmisión del paludismo (riesgo elevado, limitado y zonas donde no existe transmisión).

1.4. ANTIPALÚDICOS

1.4.1. MEDICAMENTOS DISPONIBLES PARA EL TRATAMIENTO DEL PALUDISMO

Hay un número limitado de fármacos que pueden ser empleados para el tratamiento y la prevención del paludismo. Los más antiguos como la quinina y los compuestos relacionados con ella (cloroquina, amodiaquina, primaquina y mefloquina) siguen siendo actualmente los más utilizados. También son de uso muy frecuente las combinaciones de antifolatos, como sulfadoxina/pirimetamina o atovacuona/proguanil. Se utilizan tanto para tratamiento como para profilaxis, solos o en combinación.

Probablemente la contribución más importante de los últimos 50 años en el tratamiento del paludismo ha sido el desarrollo de los derivados de la planta *Artemisa annua*, quinghaosu o artemisina. Se introdujeron desde China a principios de los años 70 y hoy en día es frente a los únicos que no han aparecido resistencias, aunque hay una serie de mutaciones que parecen tener relación con su resistencia, a una de ellas se la relaciona directamente con la resistencia *in vivo* (Jamboum, 2005). Son los más potentes y rápidos de todos los antimaláricos conocidos y hoy en día son los medicamentos de elección en el tratamiento combinado del paludismo que se pretende extender por todas las zonas endémicas (WHO, 2001).

Quinina: Derivado de la corteza del árbol de la Chinchona, fue el único medicamento usado para el tratamiento del paludismo hasta los años 30. Actúa, como la mayoría de los antipalúdicos, sobre el esquizonte eritrocítico. Sus resistencias, aunque existen en el Sudeste de Asia y las islas del Pacífico oriental, son escasas.

Cloroquina: Sintetizada en Alemania en los años 30, se desarrollo después de la II Guerra Mundial. Actúa con gran eficacia, tiene pocos efectos secundarios y un coste muy bajo. Sin embargo por su amplia utilización es el antipalúdico frente al cual el *Plasmodium falciparum* es más resistente. Se han detectado resistencias en todas las áreas endémicas, excepto Centroamérica y parte de Oriente Medio. También *P. vivax* presenta resistencia a la cloroquina.

Combinación de antifolatos: Existen varias combinaciones de inhibidores del enzima dihidrofolato reductasa (proguanil, clorproguanil, pirimetamina y termetropina) y sulfas (sulfamidas y sulfonas). Aunque estos fármacos tienen actividad antipalúdica cuando se usan solas, la resistencia parasitológica suele desarrollarse rápidamente. Cuando se usan en combinación, tienen un efecto sinérgico en el parásito y pueden ser efectivas incluso en presencia de parásitos resistentes a uno de los componentes. La combinación más frecuente es sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®, Roche), sulfametopirazina/pirimetamina (Metakelfin®), y trimetoprim/sulfametoxazol (Cotrimoxazol®). Se han probado nuevas combinaciones en África, como clorproguanil/dapsona, también conocida como LapDap® (Glaxo SmithKline) que tiene un efecto sinérgico mucho más potente, y también atovaquona/proguanil (Malarone®, Glaxo Smithkline), usado sobre todo como profilaxis.

Otros fármacos utilizados como antipalúdicos para tratamiento y profilaxis son antibióticos como la tetraciclina y la doxiciclina.

El estudio de nuevos antimaláricos no es todo lo rápido y exitoso que sería de desear. Sin embargo existen medicamentos de probada eficacia que todavía no han salido al mercado. Un ejemplo de ello es la Tafenoquina® (Glaxo SmithKline), una 8 aminoquinolona segura y bien tolerada, con una excelente actividad causal, eficaz en prevenir la infección hepática de *P. falciparum* multirresistente y de *P. vivax*.

1.4.2. RESISTENCIA A LOS ANTIPALÚDICOS

La resistencia a los antipalúdicos ha sido definida como “la capacidad de un parásito a sobrevivir y / o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de un fármaco dado a una dosis igual o mayor que la usualmente recomendada pero con tolerancia del individuo”. Esta definición fue más tarde modificada para especificar que el medicamento en cuestión debe “conseguir acceso al parásito o al eritrocito infectado durante el tiempo necesario para su acción normal” (Bruce-Chwatt, 1986).

El amplio e indiscriminado uso de los antipalúdicos produce una fuerte presión selectiva sobre el parásito para que desarrolle altos niveles de resistencia. Esta ha sido descrita para tres de las cuatro especies de parásitos del paludismo, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium malariae*. El primero ha desarrollado resistencia a casi todos los antipalúdicos utilizados, aunque la distribución geográfica de la resistencia varía mucho (Figura 3). La infección por *Plasmodium vivax*, es resistente a cloroquina y/o a primaquina en algunas áreas, como el Sudeste de Asia y algunas islas del Pacífico. (Murphy y col., 1993; Looareesuwan y col., 1997). La resistencia del *P. malariae* es todavía anecdótica, teniéndose noticia de ella en Indonesia (Maguire y col., 2002). Como mencionamos anteriormente, la resistencia de *P. falciparum* a la cloroquina ha sido descrita en todas las zonas en las que existe transmisión de esta especie excepto en zonas

palúdicas de Centroamérica y de Oriente Medio. La resistencia a la combinación sulfadoxina / pirimetamina ocurre de manera frecuente en el sudeste asiático y en Sudamérica. Esta resistencia comienza a ser prevalente en zonas de África, donde en muchos países es el medicamento de segunda intención y en otros de primera, debido a las altas tasas de resistencia a la cloroquina. La resistencia a mefloquina es frecuente en algunas áreas del sudeste asiático desde mediados de los años 90, superando en algunos casos el 50% (Rojanawastsirivet, 2004). Ha sido también descrita en la región amazónica y, de manera esporádica, en África (Mockenhaupt y col., 1997).

Se debe realizar una diferenciación entre fallo del tratamiento por resistencia o por otras causas, como el uso de dosis incorrectas, o la baja absorción del medicamento.

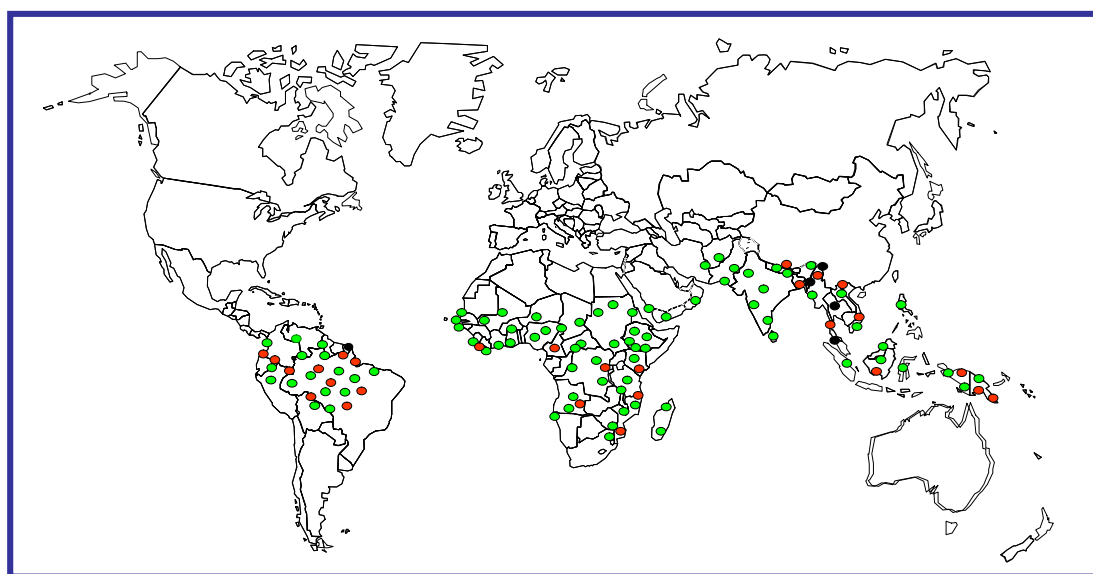


Figura 3.- Zonas en las que existe resistencia del *P. falciparum* a cloroquina ●, a sulfadoxina/pirimetamina ● y multiresistencia ●

La resistencia parece ser debida a la ocurrencia de mutaciones espontáneas que reducen la sensibilidad a un determinado fármaco o clase de fármacos. Para algunos antipalúdicos la presencia de un único punto de mutación es suficiente para poder producir resistencia, mientras que para otros es necesario que existan puntos múltiples. Se ha comprobado que la infección por los parásitos está constituida por poblaciones heterogéneas que pueden tener distintas respuestas a los medicamentos. Es decir, en un mismo individuo pueden convivir poblaciones sensibles con otras resistentes, tratándose de una misma infección (Thaithong y col., 1983). En la actualidad, técnicas como la RT-PCR permiten conocer que en algunos casos la resistencia se debe también a la presencia de más copias de los genes que codifican proteínas cuyas mutaciones tienen relación con la resistencia a algún antipalúdico, como por ejemplo el gen *pfmdr1* gen de multiresistencia (Isabel D Ferreira y col, 2006).

Después del tratamiento existe un residuo de parásitos que sobreviven al medicamento (Wernsdorfer y Payne, 1991). Bajo circunstancias normales, estos parásitos pueden ser eliminados por el sistema inmune (no específicamente en el caso de pacientes no inmunes). Los factores que disminuyen la efectividad del sistema inmune en la eliminación de parásitos parecen incrementar la supervivencia de éstos y facilitar el

desarrollo de la resistencia. Este mecanismo ha sido sugerido como un factor que ha contribuido a la resistencia en el sudeste asiático, donde los parásitos están repetidamente circulando a través de individuos no inmunes (Verdrager, 1986; Verdrager 1995). La respuesta no específica de individuos no inmunes es menos efectiva en eliminar el residuo de parásitos que la respuesta inmune específica en los individuos semiinmunes. El mismo mecanismo debe también explicar la pobre respuesta al tratamiento en niños y mujeres embarazadas (White, 1997).

El uso de la combinación sulfadoxina/pirimetamina para el tratamiento del paludismo puede incrementar la resistencia parasitológica hacia otras combinaciones de antifolatos (Watkins y col., 1999). El desarrollo de resistencias a la sulfadoxina/pirimetamina a través de la acumulación de mutaciones en el gen *dhfr* debe comprometer la vida útil de la nueva combinación de antifolatos, clorproguanil y la dapsona (LapDap®), incluso antes de que se empezara a usar. La combinación sulfadoxina/pirimetamina es de primera intención en algunos países.

P. falciparum presenta lo que se denomina “plasticidad genética” que permite al parásito una rápida adaptación a un nuevo fármaco, incluso cuando éste no está químicamente relacionada con los medicamentos previamente utilizado (Rathod y col., 1992). El mecanismo de esta plasticidad hasta ahora es desconocido, pero esta capacidad puede ayudar a explicar cómo determinados aislados y/o cepas se adaptan rápidamente a los nuevos fármacos. La elección de medicamentos con una vida media larga (sulfadoxina / pirimetamina, mefloquina) en preferencia a las de vida media más corta, tiene el beneficio de ser administradas en monodosis. Sin embargo el tener periodos de eliminación más largos beneficia la aparición de las resistencias (Watkins y Mosobo, 1993).

1.4.3. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE LAS RESISTENCIAS

En general se emplean cuatro métodos básicos para el estudio de las resistencias: pruebas *in vivo*, *in vitro*, estudios en modelos animales y caracterización mediante marcadores moleculares.

A) Pruebas *in vivo*: Consisten en el tratamiento de un grupo de individuos con paludismo clínico y parasitemia, con una dosis conocida de un determinado fármaco y el consiguiente seguimiento clínico y parasitológico. Una de las características claves de estas pruebas es la interrelación entre el hospedador y el parásito. La disminución de la eficacia terapéutica de un medicamento puede ser enmascarada por la eliminación de parásitos mediante el sistema inmune en pacientes con una alto grado de inmunidad adquirida (White, 1997). El inconveniente es que en la mayor parte de los casos no se mide la absorción del medicamento, ni los metabolitos en sangre, por tanto la resistencia real no puede ser conocida. Además en los estudios de 28 días o más en zonas de alta endemicidad también puede haber confusión con las nuevas infecciones.

B) Pruebas *in vitro*: Con éstas se evitan los numerosos factores que influyen en las pruebas *in vivo*, como el sistema inmune del hospedador. Se toman muestras de sangre periférica parasitada y se añade en placas de microensayo exponiendo a los parásitos a distintas concentraciones de antipalúdicos, comprobando finalmente si se produce la inhibición de la maduración de los esquizontes (Golenda y col., 1997). Los resultados no necesariamente se corresponden a los test *in vivo* ya que la respuesta inmune juega un papel muy importante. También influye la farmacocinética del medicamento (absorción, eliminación, etc).

C) Estudios en modelos animales: Son pruebas *in vivo* pero desarrolladas en modelos no humanos, por tanto estarán influenciadas por los numerosos factores que influyen en la prueba *in vivo* normal, salvo el efecto del factor inmune del hospedador, que está minimizado por el uso de animales de laboratorio. Una desventaja es que solo se emplean parásitos que crezcan o se adapten roedores y/o primates no humanos.

D) Técnicas moleculares: Los estudios con marcadores moleculares utilizan la PCR para indicar la presencia de mutaciones que determinen la resistencia biológica a los antipalúdicos (Plowe y col., 1995). Teóricamente, la frecuencia de la aparición de mutaciones específicas en determinados genes dentro de una muestra de pacientes de un área dada podría proporcionar una indicación de la frecuencia de la resistencia a las drogas en un área, de manera análoga a la información que se obtiene de las pruebas *in vitro*. Entre las ventajas de estos métodos se incluye la necesidad del uso de pequeñas cantidades de material genético y la posibilidad de realizar multitud de pruebas en un corto periodo de tiempo. Entre las desventajas están la necesidad de un equipamiento sofisticado y un entrenamiento para poder usarlas, así como el hecho de que las mutaciones que confieren resistencia son conocidas para un número limitado de medicamentos, primeramente para inhibidores de DHFR, como la pirimetamina, y de DHPS como la sulfadoxina (Su y Wellems, 1996). Los marcadores moleculares que son objetivo de estudio y donde se cree reside presencia de la resistencia a cloroquina son, el *cg2*, *pfmdr 1* y *pfcr1*, y finalmente el *pfgr* (Duraisingh y col., 1997; Fidock y col., 2000). Las resistencias a la atovaquona parece ser que reside en mutaciones en el complejo del citocromo *bc1* sobre el que actúa (Ittarat y col., 1994).

La confirmación de la asociación entre una serie de mutaciones dadas y la actual resistencia a los fármacos es difícil, especialmente cuando la resistencia incluye más de un locus y múltiples mutaciones. Las resistencias que han sido más estudiadas son las que están debidas a mutaciones en los genes Dihidrofolato Reductasa (DHFR) y Dihidropterato Sintasa (DHPS).

1.5. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR EN PALUDISMO

Consiste en el uso de marcadores moleculares de diversidad, de patogeneidad y/o virulencia y de resistencia en el estudio de las poblaciones de *Plasmodium falciparum*.

El genoma de *Plasmodium falciparum* es pequeño ($2,5 \times 10^7$ pb) y no permite el análisis citológico clásico por microscopía. El genoma se caracteriza por presentar una proporción elevada de adenina (A) y timina (T) que viene a ser el 80% del total. Mediante técnicas como electroforesis en campo pulsado (Kemp

y col., 1987), mediante clonación de grandes fragmentos de ADN dentro de cromosomas artificiales de levaduras, y mediante observación de los cinetocoros por microscopía electrónica (Prensier G y Col., 1986) se ha comprobado que el genoma de *Plasmodium falciparum* posee 14 cromosomas, cuyos tamaños varían entre 0,65 y 3,4 Mb (Triglia T y Col., 1992).

La diferencia encontrada en el tamaño de los cromosomas implica la rotura de regiones subteloméricas, frecuencia de la recombinación cromosómica, duplicaciones y deleciones del genoma. La diversidad genética es uno de los procesos relacionados con la reproducción sexual, fase obligatoria en el ciclo vital del parásito. La fertilización cruzada de los gametos en el mosquito vector contribuye a la generación de fenotipos distintos, ya que las infecciones naturales contienen mezclas de diferentes genotipos parasitarios (Rosario, 1981).

El conocimiento de la diversidad genética mediante estudios con marcadores moleculares, tanto de polimorfismo como de resistencia, es importante para conocer la diversidad y la implicación de las poblaciones en la transmisión y en la patología y para establecer medidas de control adecuadas. Existen numerosos estudios que muestran la amplia diversidad de *P. falciparum*, principalmente relacionados con la diversidad de los genes que codifican las proteínas de superficie del merozoíto 1 y 2 (*msp-1* bloque 2 y *msp-2*). Estos han mostrado un grado de complejidad elevado indicando que pueden concurrir poblaciones genéticamente diferentes dentro de una misma infección e individuo.

A) Diversidad y transmisión: Hay diversos estudios que señalan que la diversidad genética de un área determinada está relacionada con el nivel de transmisión (Creasey y col., 1990; Daubersies y col., 1994; Babiker y col., 1997; Konate y col., 1999). Se ha detectado una elevada prevalencia de multiplicidad de infecciones en estudios en zonas de hiper u holoendemicidad (Ntoumi y col., 1995; Beck y col., 1997) al compararlo con zonas de baja transmisión (Arnot, 1998; Paul y col., 1998; Babiker, 1998). En estos casos sólo un número de genotipos idénticos han sido encontrados en áreas de baja transmisión como Brasil (Ferreira y col., 1998), Honduras (Haddad y col., 1999) y Guayana Francesa (Ariey y col., 1999). En áreas de transmisión elevada pero estacional, donde la mayor parte de casos aparecen en la estación lluviosa coincidiendo con la mayor densidad de vectores, se han detectado densidades parasitarias y genotipos fluctuantes en infecciones crónicas (Babiker y col., 1998; Zwetyenga y col., 1999). Contrariamente en otros casos las poblaciones de parásitos permanecen estables durante estudios longitudinales (Snounou y col., 1999).

La base de la diversidad genética es la recombinación que se produce entre las fases sexuales en el mosquito. El número tan elevado de episodios clínicos que se producen durante la época de transmisión (lluviosa) puede reflejar un número elevado de mosquitos infectados con lo que conlleva a un mayor número de posibilidades de recombinación. Parece ser que la frecuencia de recombinación es más elevada cuanto mayor es la transmisión (Babiker y col., 1994; Paul y col., 1995; Conway y col., 1999).

B) Diversidad y morbilidad: Se han asociado ciertos tipos alélicos de los genes que codifican las proteínas de superficie del merozoíto 1 y 2 (*msp* 1 y *msp*-2) con la morbilidad. La familia alélica FC27 de *msp*-2 resultó ser más frecuente en individuos asintomáticos que en sintomáticos (Beck y col., 1997) y la presencia de la familia 3D7 representó una mayor protección a la aparición de sintomatología (Al Yaman y col., 1997). La diferencia en la clínica para FC27 ha sido explicada por las diferentes respuestas inmunes de los dos tipos de alelos (Beck, 1999) aunque no se ha encontrado asociación en niños (Felger y col., 1999b). El paludismo grave ha sido relacionado en Senegal con el tipo RO33 de *msp*1 (Robert y col., 1996), con el K1 en Gabón (Kun y col., 1998) y con *msp*-2 FC27 en Papúa Nueva Guinea (Al Yaman y col., 1997). Todos estos antígenos o formas antigénicas no son marcadores moleculares de virulencia pero se ha sugerido que podían estar relacionados con factores potenciales de virulencia.

C) Diversidad y edad: El número de genotipos que se encuentran infectando a un individuo parece que disminuye con la edad, dando una gran importancia a la inmunidad adquirida tras sucesivas infecciones (Ntoumi y col., 1995). El punto de mayor multiplicidad parece ocurrir en niños entre 3 y 9 años (Smith y col., 1999a), más que en niños de 1 a 2 años de edad (Felger y col., 1999a). Además, la multiplicidad más baja encontrada en adultos puede estar relacionada con bajas densidades parasitarias más que con la inmunidad específica (Smith y col., 1999b). El efecto de la edad en la diversidad de infecciones está más presente en áreas de alta transmisión (Konate y col., 1999) que en áreas de baja transmisión (Zwetyenga y col., 1998), posiblemente reflejando diferencias en los niveles de inmunidad.

Las respuesta de anticuerpos frente al bloque MSP1 y frente a MSP2 se ha correlacionado con los genotipos obtenidos por PCR. Se ha comprobado que los anticuerpos específicos hacia un genotipo parasitario tienen una vida corta relativa y representan solo la infección activa o la infección previa próxima en el tiempo (Cavanagh y col., 1998).

D) Diversidad y fármacorresistencia: La diversidad genética del paludismo influirá en la capacidad de los parásitos en escapar de la acción de los antipalúdicos. No está clara la importancia de los niveles de transmisión en el desarrollo de la resistencia. Existe alguna evidencia de que la multirresistencia se extiende más rápidamente en áreas de alta transmisión (Guigumde y col., 1994). A menudo las infecciones multiclonales pueden contener más mutantes resistentes que podrían seleccionarse bajo la presión selectiva de un medicamento (Dye y col. 1997). Si están involucrados varios genes, la multirresistencia debería extenderse más lentamente en áreas donde la recombinación es frecuente puesto que ésta disociará también combinaciones de mutaciones (Babiker y col., 1997).

1.5.1. MARCADORES MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE POBLACIONES DE *Plasmodium falciparum*

Existen numerosos marcadores que son utilizados para conocer la variabilidad poblacional de *Plasmodium falciparum*, como TRAP (proteína con similitud con la trombospondina), CSP (proteína del

circunsporozoíto), GLURP (proteína rica en glutamina) y MSP-1 y 2 (proteínas de superficie del merozoíto 1 y 2) (Sallenave-Sales y col., 2000). En el presente trabajo nos centraremos en las dos últimas, con las que hemos analizado la variabilidad existente en *P. falciparum* en los aislados de Guinea Ecuatorial. El mecanismo molecular por el cual el parásito del paludismo se une e invade la célula del hospedador se conoce poco (Bannister y Dluzewski, 1990). El parásito se une a la diana en la célula del hospedador y la invade por invaginación. Las proteínas de superficie del merozoíto (MSPs) median para que se de el reconocimiento inicial del eritrocito. Estas dos proteínas están muy bien caracterizadas y ambas se anclan por el glicosil fosfatidil inositol a la membrana plasmática del parásito (Gerold y col., 1994; Gerold y col., 1999).

A) Proteína de Superficie del Merozoíto 1 (MSP-1): El gen que codifica esta proteína se encuentra localizado en el cromosoma 9 de *P. falciparum*. Esta proteína se sintetiza durante la esquizogonia y sus productos se encuentran localizados en la superficie extracelular del merozoíto (Holder y Freeman, 1984; McBride y Heidrich, 1987). Mediante el proceso proteolítico postraducciona de la molécula precursora se generan fragmentos de 83, 42, 38 y 28–30 Kda los cuales permanecen en un complejo unido mediante fuerzas no covalentes en la superficie del merozoíto maduro (Lyon y col., 1986; Holder y col., 1992). Tras el procesamiento del fragmento de 42Kda se produce un fragmento de 19 Kda en el momento de la invasión de los eritrocitos. Solo el fragmento de 19Kda queda retenido en la superficie de los merozoítos tras su invasión a los eritrocitos (Blackman y Holder, 1992b), los otros fragmentos son eliminados antes o después de la invasión del eritrocito (Holder y col., 1985; Blackman y Holder, 1992a).

Comparando las secuencias nucleotídicas de los genes de MSP-1 en diferentes aislados de *Plasmodium falciparum* se ha visto que la secuencia aminoacídica de la proteína es variable y puede ser derivada en 17 bloques distintos, conservados, semiconservados y secuencias variables (Tanabe y col., 1987; Miller, 1994). El gen de la proteína MSP-1 del parásito puede ser agrupado por secuencias homólogas dentro de dos subgrupos distintos (McBride y col., 1985; Conway y col., 1992) correspondientes a dos familias alélicas representadas por variantes de MAD20 y aislados Wellcome (Tanabe y col., 1987; Miller, 1994) (Figura 4).

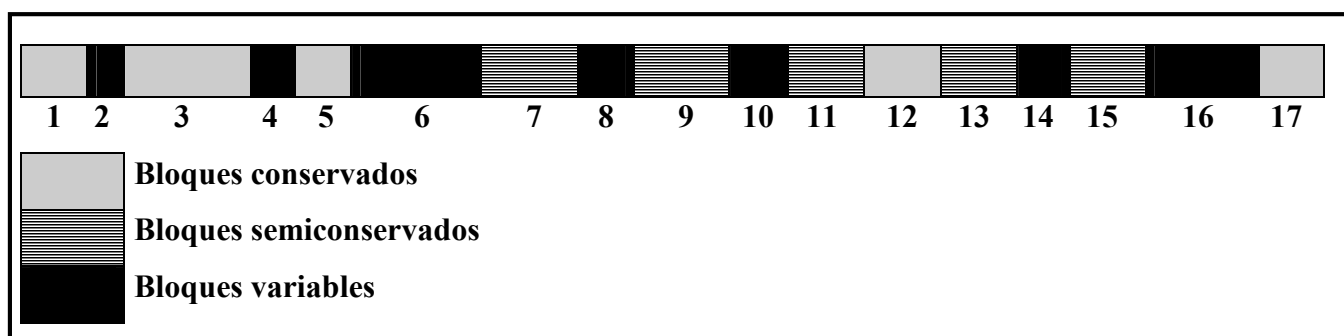


Figura 4.- Gen de la proteína MSP-1 de *Plasmodium falciparum* donde se detallan cada uno de los bloques en los que se encuentra dividido.

B) Proteína de Superficie del Merozoito 2 (MSP-2): El gen que codifica esta proteína se encuentra situado en el cromosoma 2 de *P. falciparum*. Es también una glicoproteína polimórfica, cuyo tamaño varía de 45 a 55 Kda. Este gen se había estudiado en aislados de laboratorio mediante serología (Ramasamy, 1987; Fenton y Walliker, 1990; Fenton y col., 1991) y por hibridación de genes amplificados mediante PCR (Marshall y Coppel, 1993; Marshall y col., 1994). Además se ha realizado secuenciación del gen proveniente de muestras de laboratorio. Esto ha permitido dividir en dos grupos alélicos a esta proteína, FC27 y 3D7. El gen está constituido por cinco bloques, uno variable, dos semiconservados y dos conservados. En el bloque variable es donde se han detectado las distintas variantes de la proteína (Figura 5).

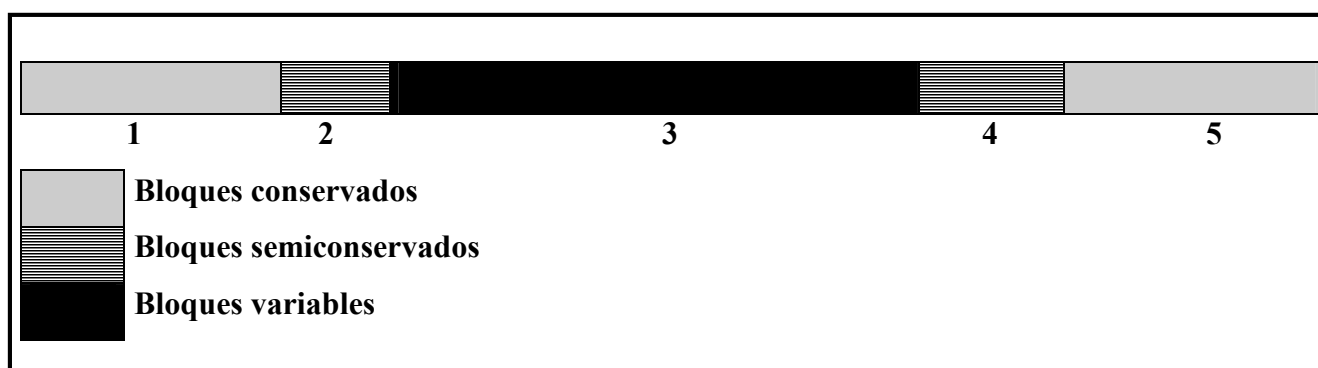


Figura 5.- Gen de la proteína MSP-2 de *Plasmodium falciparum* en el que se detallan cada uno de los bloques en los que se encuentra estructurado.

Ambas proteínas son altamente antigénicas, por ello se han utilizado y están en una gran parte de las vacunas que se están desarrollando contra el paludismo. Al ser estas proteínas altamente polimórficas se piensa que estas vacunas podrían ser efectivas para una determinada población de parásitos y menos efectivas para otras.

Para el estudio de estas dos proteínas se han utilizado varias estrategias, como la técnica Restricción de Fragmentos de Longitud Polimórfica (RFLP) y la hibridación, pero los avances más importantes se realizaron mediante el uso de la PCR. Mediante esta técnica se ha podido comprobar que un paciente que presente paludismo por *Plasmodium falciparum* puede contener varias poblaciones de parásitos, es decir, poblaciones de parásitos con distintos MSP-1 y MSP-2.

Para comprobar dónde se origina dicha variabilidad genética se han realizado distintos estudios. Babiker y colaboradores (1994) realizaron el estudio de hembras de anofelinos y comprobaron que es en su interior donde se produce la recombinación entre las distintas poblaciones de parásitos, con lo cual el mosquito al introducir los esporozoítos introduce poblaciones nuevas del parásito. Conway y McBride (1991) realizaron un estudio en una zona hiperendémica y llegaron a la conclusión de que el número de poblaciones del parásito es mayor en las zonas en las que la transmisión es elevada, mientras que cuando existe una marcada estacionalidad del paludismo, el tiempo en el que no existe transmisión permite que se produzcan en el mosquito procesos de deriva génica provocando la desaparición de algunas poblaciones del parásito.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ESTUDIOS DE EFICACIA TERAPÉUTICA *IN VIVO*

2.1.1. AREA Y POBLACION DE ESTUDIO

Guinea Ecuatorial está localizado en la costa oeste de África Central, en el Golfo de Guinea. Tiene una extensión total de 28.068 km² dividida en una región continental y una insular (Figura 6) y un número aproximado de 475.000 habitantes. La isla de Bioko representa la mayor parte de la región insular (compuesta además por las islas de Annobón, Elobey Grande, Elobey Chico y Corisco). Malabo es la principal ciudad de la isla además de ser la capital del país, con aproximadamente 70.000 habitantes. La isla de Bioko presenta dos estaciones climáticas una lluviosa (de mayo a octubre) y una seca (de noviembre a abril).

En la región continental (Río Muni) la ciudad principal es Bata con aproximadamente 60.000 habitantes. Esta región tiene cuatro estaciones, dos lluviosas (de abril a junio y de octubre a diciembre) y dos secas (de enero a marzo y de julio a septiembre).



Figura 6. Mapa de Guinea Ecuatorial

En Guinea Ecuatorial el paludismo es una enfermedad hiperendémica con transmisión perianual aunque con pequeños picos durante las estaciones lluviosas. Más del 80% de las infecciones se deben al *Plasmodium falciparum*, seguido del *P. malariae* (18%) (Roche J y col., 1996). La tasa de inoculación entomológica (TIE) que se define como picaduras por persona y año, varía en el tiempo y en función de la zona donde se mida, de tal manera que en determinadas localidades de la Región Insular es de 261 picaduras/persona/año para el *Anopheles gambiae* y 552 para el *Anopheles funestus*, sin diferencias entre estaciones, mientras que en la Región Continental la tasa fue de 9,8 picaduras /persona/año en estación seca y 58 en lluviosa para *Anopheles gambiae* y 71,54 en seca y 39,85 en lluviosa para *Anopheles funestus*. (Cano J y col., 2004). Estas tasas de inoculación son de las más elevadas en África.

Los estudios de eficacia terapéutica realizados en Guinea Ecuatorial, se llevaron a cabo en los Hospitales Regionales de Malabo y Bata durante los años 1999, 2001 y 2002. Desde mayo a diciembre de 1999 el estudio se efectuó en el Hospital Regional de Malabo, abarcando tanto estación húmeda como seca, y desde enero a diciembre de 2001 se realizó en ambas regiones, intentando dar así una visión más global de las resistencias en Guinea Ecuatorial. El estudio de la respuesta al tratamiento combinado se realizó de enero a agosto de 2002 también en los Hospitales Regionales de Malabo y Bata. En los tres casos el trabajo se llevó

a cabo con pacientes (niños menores de 5 años) que acudieron a las consultas externas del servicio de pediatría donde se les diagnosticó paludismo (Figura 7).

Los estudios se realizaron frente a los tres antipalúdicos de 1ª, 2ª y tercera línea en el tratamiento del paludismo en Guinea Ecuatorial que eran cloroquina, sulfadoxina/pirimetamina y quinina. Durante el año 2002 se comparó la eficacia de la sulfadoxina/pirimetamina frente a un combinado (sulfadoxina/pirimetamina más artesunato) de nueva utilización en el país.



Figura 7. Pabellón Infantil, Hospital General de Bata (Guinea Ecuatorial)

2.1.2. MUESTREO Y SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

Los pacientes se seleccionaron y se clasificaron de acuerdo con los criterios del protocolo de estudio de las resistencias *in vivo* de la OMS (WHO, 1996):

Casos no complicados:

- Edad comprendida entre 6 y 59 meses.
- Infección monoespecífica de *Plasmodium falciparum* con una parasitemia comprendida entre 2000-200000 parásitos asexuales por microlitro de sangre. Se excluyen las infecciones mixtas.
- Ausencia general de signos de gravedad y/o peligro:
 - El niño es incapaz de beber o mamar.
 - Niño con vómitos o diarrea.
 - Convulsiones recientes.
 - El niño está en estado letárgico o inconsciente.
 - Incapacidad de estar de pie o sentado.
 - Malnutrición severa
- Ausencia de estados febriles debido a otras enfermedades.
- Hemoglobina >5 g/dl y/o Hematocrito > 15%.
- Si el tratamiento es de sulfamidas ver si es alérgico.

- Ausencia de infecciones susceptibles de aumentar el riesgo de reacción indeseable grave a los medicamentos utilizados en el estudio, por ejemplo eccema o exantema.
- Ausencia de historia de tratamientos previos.
- Consentimiento claro de los padres o tutores del niño.

La aplicación de la prueba debe subordinarse en todo momento al estado clínico del enfermo.

Casos complicados:

El paludismo grave se define por la presencia de uno o varios de los siguientes criterios en presencia de una parasitemia asexual:

- Paludismo cerebral (coma arreactivo) *
- Anemia normocítica grave ($Hb < 5g/dl$)
- Insuficiencia renal (creatinina sérica $> 3,0mg/dl$)
- Edema pulmonar y síndrome de distrés respiratorio del adulto
- Hipoglucemia ($< 40 mg/dl$)
- Colapso circulatorio o estado de choque (TA sistólica $< 70mm Hg$ en los adultos ó $< 50 mmHg$ en los niños menores de 5 años).
- Hemorragias espontáneas o coagulación intravascular diseminada.
- Convulsiones generalizadas y repetidas.
- Acidosis metabólica con distrés respiratorio
- Hemoglobinuria macroscópica
- Alteraciones hidroelectrolíticas



Otras manifestaciones:

- Pérdida de la conciencia, menos profunda que un verdadero coma.
- Postración o debilidad extrema (incapacidad de mantenerse de pie o sentado).
- Hiperparasitemia ($> 5\%$ de eritrocitos infectados)
- Ictericia (bilirrubina sérica total $> 3mg/dl$)
- Hipertermia (temperatura axilar $> 39,5^{\circ}C$)

*Después de una convulsión generalizada, el estado de coma debe perdurar al menos 30 minutos para poder distinguirlo del coma transitorio después de las convulsiones.

Para calcular el tamaño mínimo de la muestra en el caso de tratamientos con un solo medicamento se fijaron dos umbrales, uno es la proporción de fracasos que se juzga aceptable (P_a) y el que se juzga inaceptable (P_o). La proporción de fracasos considerada como inaceptable no se puede fijar más que dentro de un programa nacional, ésta varía de un programa a otro, pues depende de los recursos financieros,

administrativos y humanos disponibles. Para Guinea Ecuatorial se decidió en el caso de paludismo no complicado los valores de P_o y P_a como 0,45 (45% de fracasos) y 0,27 (27%) respectivamente. En el caso de paludismo grave y complicado $P_o = 0,25$ (25% de fracasos) y $P_a = 0,12$ (12%).

El tamaño de la muestra se calculó en dos etapas (n_1 y n_2). En la primera de ellas, según los umbrales decididos, se selecciona y sigue a lo largo del tiempo una pequeña muestra poblacional, (casos no complicados $n_1 = 11$, casos complicados $n_1 = 16$). Si tras el estudio del nivel de resistencia en dicha muestra los resultados son extremos, es decir, si se encuentra una tasa muy baja (1 o ningún caso complicado, ningún caso grave) o muy elevada de fracasos, la muestra es suficiente y se pueden deducir directamente las conclusiones de resistencia, es decir, si ésta es baja o elevada. Por el contrario si los resultados son dudosos, se toma una segunda muestra ($n_2 = 33$ para los no complicados, y 48 para los complicados) y se deducen las conclusiones de los resultados agrupados de las dos muestras ($n_1 + n_2 = 44$ para paludismos no complicados y 63 para los complicados).

Para calcular el tamaño mínimo de la muestra en el estudio de la respuesta al tratamiento combinado se tuvo en cuenta:

- Tamaño de la población de la que se saca la muestra: niños <5 años (66.404)
- Prevalencia esperada del factor estudiado: en el caso de la resistencia a la sulfadoxina/pirimetamina esperamos una prevalencia del 30%. Cuando se combina con artesunato la prevalencia esperada baja hasta el 5%.
- El valor más alejado de la prevalencia esperada que se aceptaría: en el caso de sulfadoxina/pirimetamina sería inaceptable superar el 40% y combinado con artesunato pasar el 10%.

El tamaño de la muestra varía según el nivel de confianza. En el estudio de la sensibilidad a la sulfadoxina/pirimetamina para adquirir un nivel de confianza del 90% se necesita estudiar 57 casos y para el 95% 81. En la terapia combinada para el 90% se necesitan 51 y para el 95% 73.

Las consideraciones éticas fueron aceptadas por el Comité Ético del Programa Nacional de Lucha Antipalúdica del Ministerio de Sanidad de Guinea Ecuatorial y por la Comisión Ética del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.

2.1.3. TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES

El día 0 (D0), día en el que se inicia el estudio, se registraron los datos del enfermo (sexo, edad, peso, antecedentes clínicos), la evaluación clínica (toma de la temperatura y tensión arterial, exploración), y la toma de muestras para el laboratorio (parasitemia, hemoglobina y/o hematocrito, glucemia).

El diagnóstico y confirmación de la infección por *P. falciparum* se realizó por microscopía óptica a través de extensión fina y gota gruesa. A todos los pacientes se les recogió sangre capilar los días 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 o cualquier otro día en el que el paciente empeorara. Dichas muestras se tiñeron con Giemsa al

10% durante 10-15 minutos, tras haberlas fijado con metanol. La densidad parasitaria se calculó contando los parásitos en fase asexual encontrados frente a 200 leucocitos, asumiendo que el recuento de células blancas es de 8000/ μ l de sangre (WHO, 1991). En el momento de tomar la muestra para la extensión se toma una muestra en papel de filtro (Whatman n°3) para realizar posteriormente extracción de ADN y llevar a cabo el análisis mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Dichas muestras se secaron a temperatura ambiente, se colocaron en bolsas de plástico separadas y se almacenaron a -20° C.



El estudio de eficacia terapéutica se dividió en dos partes:

A) Estudios con monoterapia: en el momento del diagnóstico (día 0) se asignaba a cada paciente el medicamento a recibir.

- Fosfato de cloroquina 100 ó 150 mg (Pharmamed Lda., Malta) 25 mg/kg/d durante tres días
- Sulfadoxina 500mg / pirimetamina 25mg (S/P) (Pharmamed Lda., Malta) 25/1,25 mg/kg en dosis única.
- Sulfato de quinina 200 ó 300 mg (Pharmamed Lda., Malta) 25 mg/kg/d en tres dosis durante 7 días.

Tanto la cloroquina como la S/P se dieron bajo supervisión directa. Los casos complicados se hospitalizaron y trataron con clorato de quinina 300 mg/ml (Pharmamed Lda., Malta) vía intravenosa (20 mg/kg en suero glucosado 5% (5-10 ml/kg, según el balance hídrico general del paciente) a pasar en 4 horas, seguido cada 8-12 horas del inicio de 10 mg/kg).

A los pacientes que no respondieron al tratamiento se les administró medicamentos de segunda y tercera intención como sulfadoxina/pirimetamina, quinina o artesunato (Guilin Pharmaceutical Works, Guanxi, China) más mefloquina (Eloquin®, Medochemic Ltd, Chipre).

B) Estudio de la terapia combinada: se asignaba de manera randomizada a los niños en el día 0 a un grupo de tratamiento.

- Sulfadoxina/pirimetamina (500mg y 25mg respectivamente) (Pharmamed Lda., Malta) 25/1,25 mg/kg en dosis única
- Sulfadoxina/pirimetamina (en la misma dosis) más artesunato (Guilin Pharmaceutical Works, Guangxi, China) 4 mg/kg diariamente durante 3 días.

Todos los niños recibieron la medicación bajo supervisión directa. Los pacientes que no respondieron al tratamiento se les administraron sulfato de quinina 200 ó 300 mg (Pharmamed Ltd. Malta) 25mg/kg diariamente en 3 dosis durante 7 días. Los casos de malaria complicada fueron hospitalizados con dihidroclorato de quinina 300mg/ml (Pharmamed Ltd. Malta) administrado vía intravenosa (dosis igual que en punto anterior).

En el caso del estudio de monoterapia se realizaron visitas de revisión clínica y parasitológica a los pacientes incluidos en el estudio, los días 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28, mientras que en el estudio de la terapia combinada se le hizo el seguimiento sólo durante 14 días. Durante estas visitas se llevaba a cabo un breve examen clínico, incluyendo la toma de la temperatura axilar. Se les insistió a los padres o tutores que en cualquier momento que el niño empeorara o se encontrara enfermo acudieran a nuestro laboratorio.

Durante el estudio no sólo se comparó la respuesta al tratamiento sino también la eliminación del parásito, gametocitos en sangre los días 7 y 14 y cambios del hematocrito entre el día 0 y el 14 en ambos grupos terapéuticos. La respuesta clínica y parasitológica se clasificó de acuerdo con los criterios de la OMS de 1996 donde se distinguen tres categorías:

Fracaso Terapéutico Precoz (FTP):

- Aparición de signos de peligro o de paludismo grave en los días 1, 2 ó 3 en presencia de parasitemia.
- Temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ el día 2 con una parasitemia superior a la del día cero.
- Temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ el día 3 en presencia de cualquier parasitemia.
- Parasitemia en el día 3 \geq al 25% que la del día cero.

Fracaso Terapéutico Tardío (FTT):

- Aparición de signos de peligro o de un paludismo grave en presencia de parasitemia no importa el día entre el 4º y el 14º ó 28º sin que el paciente haya tenido con anterioridad un fracaso terapéutico precoz.
- Temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ en presencia de parasitemia no importa el día entre el 4º y el 14º ó 28º sin que el paciente haya tenido con anterioridad una respuesta, según criterios, de fracaso terapéutico precoz.

Respuesta Clínica Adecuada (RCA):

- Ausencia de parasitemia el día 14 ó 28 cualquiera que sea la temperatura axilar, sin que el paciente haya cumplido con anterioridad los criterios de FTP o FTT.
- Temperatura axilar menor que $37,5^{\circ}\text{C}$ el día 14 ó 28 con o sin parasitemia sin que el paciente haya cumplido los criterios de FTP o FTT.

2.2. ESTUDIO MOLECULAR DEL MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN

En el día 0 (D0) se tomaba una muestra de sangre en papel Whatman, del cual se procedía a la extracción del ADN del parásito. Se recortó una porción del papel con la sangre del paciente (un círculo de 0,5 cm de diámetro) a partir de la cual se efectuó la extracción de ADN mediante el método de Chelex (Walsh y col., 1991). Dicho fragmento se dispuso en un tubo Eppendorf con 1 ml de agua destilada. Se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando la muestra cada cierto tiempo. Se centrifugó 3 minutos a 14.000 r.p.m retirando el sobrenadante y dejando 5µl de mezcla aproximadamente. Se añadieron 200 µl de Chelex® (BioRad) al 5% (previamente agitado) y se incubó a 56°C durante 30 minutos. A continuación se agitaron las muestras y se incubaron a 100°C durante 10 minutos. Se volvieron a agitar y se

centrifugaron 3 minutos a 14.000 r.p.m antes de ser usadas. El ADN queda en el sobrenadante de la muestra, dicho sobrenadante se retira con cuidado del precipitado de Chelex (queda al fondo) y se pasa a un tubo limpio, de tal manera que cuando se use para PCR evitamos la toma de muestra con Chelex que puede inhibir la reacción.

2.2.2. ESTUDIO MEDIANTE PCR DE LA VARIABILIDAD DE LOS GENES *msh-1* Y *msh-2*

La variabilidad genética dentro de la especie *Plasmodium falciparum*, así como la multiplicidad de infección, se puede conocer mediante el estudio de los polimorfismos existentes en los genes que codifican las proteínas de superficie del merozoito 1 y 2 (MSP-1 y MSP-2). Mediante el estudio de ambos genes se compararon las poblaciones de parásitos existentes en la muestra inicial (D0) y cuando aparece fallo terapéutico, ya sea en el D7, D14, D21 ó D28, de un mismo paciente, para intentar diferenciar auténticas resistencias (aparecen poblaciones ya detectadas en el día 0) de reinfecciones (se detectan nuevas poblaciones con respecto a las que aparecen en el día 0).

Una vez terminada la extracción de ADN, se realizó una PCR anidada (Rubio y col., 1999) capaz de amplificar las regiones polimórficas de los genes que codifican estas dos proteínas, siguiendo el protocolo establecido por Robert y col. (1996), con ciertas modificaciones para estandarizar el protocolo en nuestro laboratorio.

A.- Estudio del gen *msh-1*

La primera PCR para el gen *msh-1* se realizó con dos cebadores denominados MSP-1A y MSP-1B. A partir de esta primera amplificación se realizó una segunda con distintos cebadores que permitieron conocer la variabilidad de este gen para las familias alélicas MAD20, K1 y R033. Los cebadores usados en la segunda PCR fueron MSP1-R1 y MSP1-R2 para la familia alélica R033. Para el resto de alelos se usaron los cebadores MSP1-M1 y MSP1-M2 en el estudio de la familia alélica MAD20 y los cebadores MSP1-K1A y MSP1-K1B en el de la familia alélica K1 (el número de fragmentos obtenidos en la PCR en ambos casos fue variable en función del polimorfismo que presentó el gen para cada familia).

B.- Estudio del gen *msh-2*

Para el estudio del gen *msh-2* se realizó también una primera amplificación con los cebadores MSP2-1 y MSP2-4. A partir de ésta se realizó una segunda amplificación con cebadores que nos permitieron distinguir la variabilidad en las familias alélicas 3D7 y FC27, donde los cebadores usados fueron 3D7a y b y FC27a y b respectivamente. En ambos casos el número de fragmentos obtenidos fue variable. Para la realización del estudio comparativo entre recaídas y reinfecciones al realizar la 2ª PCR de *msh-2* no se distinguieron familias, y los cebadores utilizados fueron MSP2-2 Y MSP2-3. Los nombres y secuencia de los cebadores utilizados aparecen indicados en la tabla 1. En la figura 8 aparecen indicadas las posiciones de cada uno de los cebadores sobre los genes que codifican las proteínas de superficie del merozoito 1 y 2.

Tras la PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa D5 (Pronadisa®) al 2.5% teñido con Bromuro de Etidio al 0.5µg/ml. Se utiliza un marcador de 100pb (Biotools®) para poder determinar el tamaño de los fragmentos de amplificación obtenidos en cada caso. Para visualizar los fragmentos de amplificación se utilizó el programa informático MultiAnalyst Software-GelDoc 1000 (BioRad®) (SE+-25pb). La variación de la longitud de los fragmentos es continua, los agrupamos en grupos de 25 pares de bases.

CEBADORES PARA MSP-1 Y MSP-2

Cebadores para MSP-1	Secuencia	Acción	Diana
MSP-1A	5'-AAGCTTTAGAAAGATGCAGTATTGAC-3'	1ª PCR	MSP-1
MSP-1B	5'-ATTCATTAATTTCTTCATATCATC-3'		
MSP1-R1	5'-GCAAATACTCAAGTTGTTGCAAAGC-3'	2ª PCR	Familia RO33
MSP1-R2	5'-AGGATTTGCAGCACCTGGAGATCT-3'		
MSP1-M1	5'-GAACAAGTCGAACAGCTGTTA-3'	2ª PCR	Familia MAD20
MSP1-M2	5'-TGAATTATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGA-3'		
MSP1-K1A	5'-GAAATTACTACAAAAGGTGCAAGTG-3'	2ª PCR	Familia K1
MSP1-K1B	5'-AGATGAAGTATTTGAACGAGGTAAAGTG-3'		
Cebadores para MSP-2	Secuencia	Acción	Diana
MSP2-1	5'-ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATTATA-3'	1ª PCR	MSP-2
MSP2-4	5'-ATATGGCAAAAGATAAAACAAGTGTGCTG-3'		
MSP2-2	5'-AACGAATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGT-3'	2ª PCR	
MSP2-3	5'-GATGAATTCTAGAACCATGCATATGTCCATGTT-3'		
MSP2-3D7a	5'-AGAAGTATGGCAGAAAGTAAGCCTCCTACT-3'		Familia FC27
MSP2-3D7b	5'-GATTGTAATTCGGGGGATTGAGTTGTTTCG-3'		
MSP2-FC27a	5'-GCAAATGAAGGTTCTAATACTAATAG-3'		
MSP2-FC27b	5'-GCTTTGGGTCCTTCTTCAGTTGATTC-3'		

Tabla 1. Nombres y secuencias de los cebadores utilizados para la PCR de *msp-1* y *msp-2*

En el estudio comparativo (recaída-reinfección), tanto la muestra original como la del post-tratamiento corrieron en carriles adjuntos para hacer más fácil la comparación, siendo en este caso el tamaño absoluto del fragmento menos importante (Figuras 9 y 10).

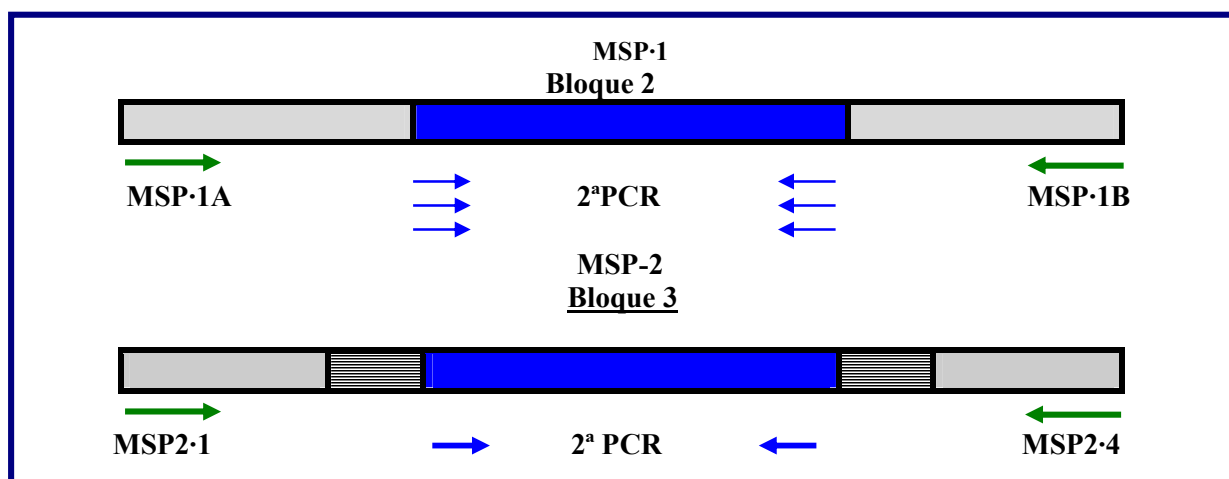


Figura 8. Situación de los cebadores en los genes MSP 1 y 2. Los cebadores usados en la primera amplificación aparecen en color verde y los usados en la segunda en color azul.

El genoma haploide del parásito en la mayor parte de su ciclo biológico simplifica la identificación de las infecciones múltiples. Tras la realización de la PCR para el estudio de los genes que codifican MSP-1 y MSP-2 podemos obtener más de una banda de amplificación por aislado, esto nos indica que el paciente está parasitado por más de una población de *Plasmodium falciparum*. Estas infecciones múltiples las cuantificamos con el índice de multiplicidad (MOI) que nos indica el número mínimo de poblaciones que hay en un individuo, que generalmente es menor que el real (Contamin y col., 1995). Este índice se puede determinar para el gen MSP-1, MSP-2 o para ambos.

Los cebadores utilizados para el estudio de los genes que codifican las proteínas MSP-1 y MSP-2 aparecen reflejados en la tabla 2, donde se indica la familia alélica que amplifica así como la temperatura de alineamiento.

CEBADORES PARA MSP-1 Y MSP-2			
<u>Nombre del cebador</u>	<u>T°</u>	<u>Acción</u>	<u>Diana</u>
MSP-1A / MSP1-1B	55°C	1ª PCR MSP-1	MSP-1
MSP1-R1 / MSP1-R2	62°C	2ª PCR MSP-1	RO33
MSP1-M1 / MSP1-M2	68°C	2ª PCR MSP-1	Mad20
MSP1-K1A / MSP1-K1B	62°C	2ª PCR MSP-1	K1
MSP2-1 / MSP2-4	57°C	1ª PCR MSP-2	MSP-2
MSP2-3D7a / MSP2-3D7b	68°C	2ª PCR MSP-2	3D7
MSP2-FC27a / MSP2-FC27b	68°C	2ª PCR MSP-2	FC27
MSP2-2 / MSP2-3	57°C	2ª PCR MSP-2	MSP-2

Tabla 2. Nombres de los cebadores utilizados para cada una de las PCRs así como la temperatura de anillamiento y la diana sobre la que actúan.

La mezcla de reacción utilizada tenía como volumen final 25µl para ambas PCR. Para la reacción de amplificación se utilizaba los siguientes reactivos indicando las concentraciones finales: solución de la enzima (1X), mezcla de los cuatro nucleótidos (0,2mM), 0,75 unidades de polimerasa y cebadores (1µM), 0,3µg /µl de ADN molde.

2.3. ANÁLISIS DE DATOS Y DEFINICIONES

Para poder realizar la diferenciación en las muestras entre recaídas y reinfecciones se tomó el grupo de muestras del estudio de sensibilidad *in vivo* realizado en Malabo en el año 1999 que tuvieron un fracaso terapéutico tardío. Se analizaron pares de muestras de cada individuo: una antes del tratamiento (**O**) y otra cuando el parásito reaparece (**R**) ya fuera el día 7, 14, 21 ó 28. Se definió como auténtica recrudescencia o resistencia de un parásito R al medicamento a la presencia de productos de PCR idénticos en las muestras O y R del paciente. Si sólo parte de los alelos encontrados en O se hallaron en R, entonces las poblaciones de parásitos de la muestra original serían mixtas, sensibles y resistentes.

En el otro extremo si los parásitos encontrados en O tuvieran todos los alelos diferentes a los encontrados en R, éstos representarían una nueva población. Si sólo se diferencian en un locus, se determinaría la frecuencia de aparición del alelo común. Si es frecuente se interpreta como una reinfección. Si la frecuencia de aparición es baja, se asume como una recrudescencia del parásito R.

El análisis estadístico se realizó mediante EpiInfo 2002 (DCC Atlanta USA y OMS, Ginebra, Suiza) y SPSS (SPSS for Windows 12, SPSS Inc.)

Las medidas globales consistieron en porcentajes e intervalos de confianza del 95% para variables categóricas y medias y sus desviaciones estándar para variables continuas. Un p-valor menor de 0,05 fue considerado como significativo.

La comparación entre proporciones se hizo mediante el test Chi cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher si alguna de las frecuencias esperadas era menor de 5.

Mediante modelos de regresión logística se analizó la relación de la multiplicidad de infección con la localización geográfica de las muestras, con el año de la recogida de las mismas, con la resistencia y con la gravedad de la infección. Del mismo modo se realizó con la variabilidad genética. Este modelo de regresión logística también se utilizó para analizar las diferencias de multiplicidad o variabilidad entre los grupos de edad.

Se utilizaron pruebas no paramétricas de Kolmogorov-Smirnov para comparar la densidad parasitaria entre los grupos de infección múltiple o única. Y también se utilizó el índice no paramétrico de Kruskal Wallis para comparar la media estimada de parásitos entre los 5 grupos de edad resultantes. Todo ello, después de un test previo de normalidad de Kolmogorov.

Para la evaluación de la tendencia de la densidad parasitaria con respecto al MOI se utilizaron modelos de regresión lineal.

Estudio de *msp-1*

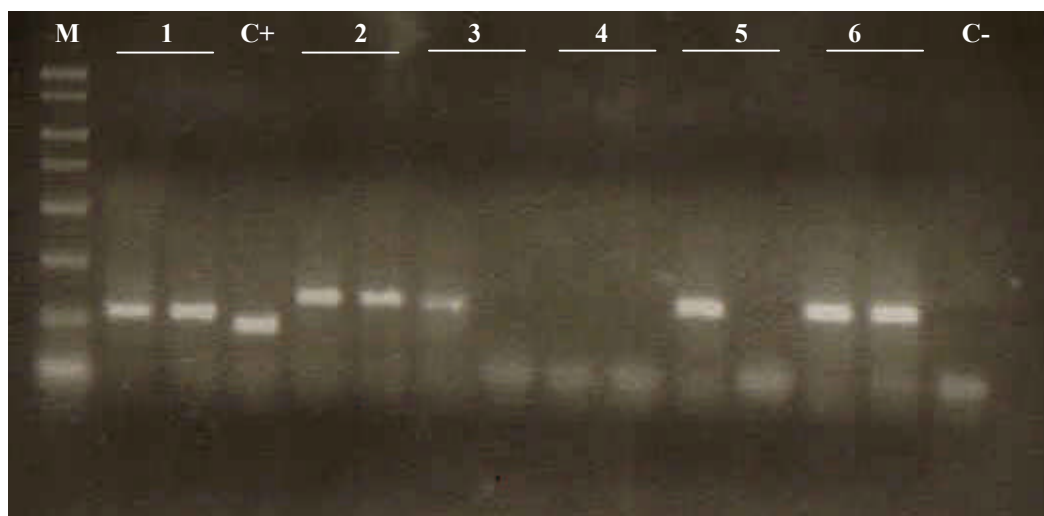


Figura 9. Resultado de la PCR con los cebadores MSP1-K1A y K1B. En las muestras 1, 2 y 6 se observa la misma población para la familia K1. En las muestras 3 y 5 son diferentes antes y después del tratamiento.

Estudio de MSP-2

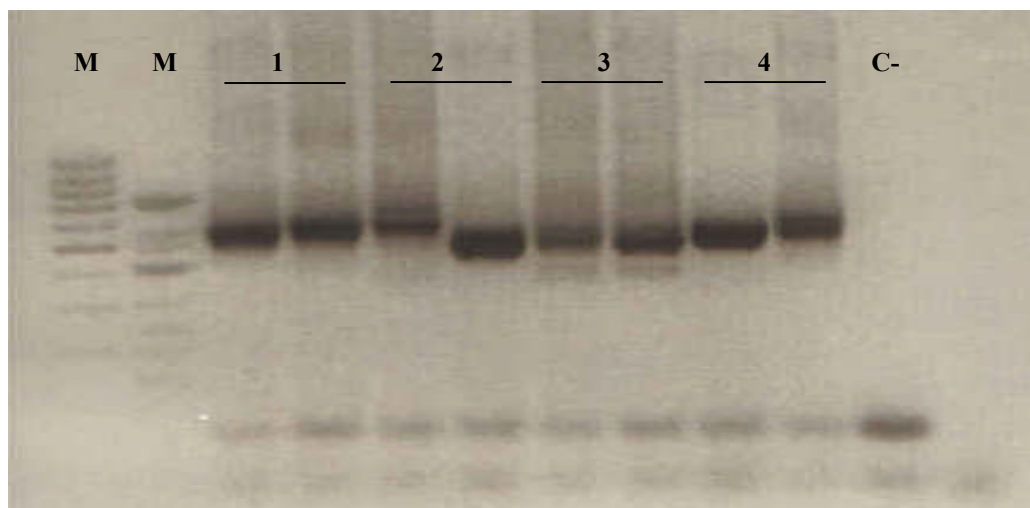


Figura 10. Resultado de la PCR con los cebadores MSP2. En las muestras 1 y 3 se observa la misma población para la familia MSP2. En las muestras 3 y 5 son diferentes antes y después del tratamiento.

3. OBJETIVOS

3.1.- Estudiar el nivel de resistencia a distintos antipalúdicos en Guinea Ecuatorial mediante estudios de eficacia terapéutica *in vivo* para analizar su evolución a lo largo de los años y determinar las posibles opciones de tratamiento.

3.1.1.- Establecer el nivel de resistencia a los medicamentos de 1ª, 2ª y 3ª línea para el tratamiento del paludismo no complicado (cloroquina, sulfadoxina/pirimetamina y quinina oral) y de 1ª línea para el tratamiento del paludismo complicado (quinina IV).

3.1.2.- Determinar la respuesta al tratamiento combinado sulfadoxina/pirimetamina-artesunato como opción terapéutica en el paludismo no complicado.

3.1.3.- Diferenciar, en los casos de fracaso terapéutico tardío, las recaídas producidas por parásitos resistentes de las nuevas infecciones mediante el análisis de la estructura genética del *Plasmodium falciparum*, para ajustar los niveles de resistencia encontrados en los estudios *in vivo*.

3.2.- Establecer la diversidad alélica mediante el análisis de los genes de las proteínas de superficie del merozoíto 1 y 2 (MSP-1 y MSP-2) de *Plasmodium falciparum* en aislados de pacientes.

3.2.1.- Conocer la diversidad poblacional en dichos aislados y estudiar la multiplicidad de la infección en los pacientes.

3.2.2.- Determinar las poblaciones parasitarias circulantes en Guinea Ecuatorial.

3.2.3.- Determinar las posibles diferencias entre los índices de multiplicidad y diversidad del parásito en los diferentes grupos definidos de población, según densidad parasitaria, edad, sensibilidad a los antipalúdicos, complicación de la enfermedad, variaciones en el tiempo y geográficas.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIOS *IN VIVO* DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA A DIFERENTES ANTIPALÚDICOS

4.1.1 ESTUDIO DE EFICACIA TERAPEUTICA REALIZADO EN EL AÑO 1999

Desde mayo hasta diciembre de 1999, se seleccionaron 275 niños que cumplían los criterios de inclusión (Materiales y Método pag. 15) de todos los pacientes que acudían a las consultas externas del Pabellón Infantil (Hospital Regional de Malabo). De estos 275 seleccionados finalizaron el estudio (al menos 7 días) 133 niños, de los cuales 22 correspondían al grupo de cloroquina, 45 al de sulfadoxina/pirimetamina (S/P) y 66 al de quinina.

Los abandonos del estudio fueron debidos a toma previa de antipalúdicos, no acudir a las revisiones programadas o rechazo a ingresar por parte del responsable del niño, mala administración de los medicamentos (error en la frecuencia, la dosis o la duración del tratamiento). Durante el periodo que duró el estudio no se registró ninguna defunción.

4.1.1.1 Características de los niños incluidos en el estudio

Al inicio del estudio, se recogieron una serie de datos generales del niño (edad, peso), características clínicas (temperatura, hemoglobina, hematocrito) y parasitológicas. Se calcularon las medias de dichos parámetros para los tres grupos de estudio, cloroquina, S/P y quinina, las cuales aparecen reflejadas en la tabla 4.

	Cloroquina	S/P	Quinina
Edad media (meses)	25	31	24
Peso medio (Kg)	11,3 (8,4-15,5)	12,1 (5,8-20)	10,7 (6,5-16,5)
Temperatura media (°C)*	37,4 (36-39,3)	37,2 (36-40)	37,2 (35-40)
Fiebre *	6 (28,6%)	13 (28,8%)	27 (40,9%)
Hemoglobina media*	9,5 (6-12)	9,3 (6-12,5)	9 (5,2-13)
Hematocrito medio*	31,7 (17-41)	31,4 (23-40)	29,4 (20-36)
Parasitemia media /µl *	20.428 (2.500-85.050)	12.000 (2.000-76.800)	14.040 (2.220-1.135.560)

Tabla 4. Características iniciales de los niños incluidos en el estudio. * Datos recogidos en el momento de la admisión.

Las características generales al inicio del estudio fueron similares en los tres grupos, no detectándose diferencias significativas entre las variables que se tuvieron en cuenta. El criterio de temperatura $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ durante la visita incluido en los criterios de la OMS para la realización de los estudios *in vivo*, no se valoró a la hora de incluir a los niños en el estudio, ya que este dato en muchas ocasiones era dado por la madre haciendo referencia a la temperatura del niño la tarde anterior u horas antes de la admisión.

Otro parámetro que se determinó en el momento del ingreso fue la glucemia capilar, que sólo en tres casos se encontraba por debajo de 60 mg/dl (ninguno por debajo de 50 mg/dl). La tensión arterial se tomó a todos los niños que ingresaban en el hospital con posible paludismo complicado y sólo un caso presentó hipotensión (TAS < 50 mm Hg).

En las tablas 5, 6 y 7 aparecen de una forma más detallada algunas de las características de la población que se consideraron más relevantes en el estudio como la edad, la hemoglobina y hematocrito así como la parasitemia.

Edad (meses)	Nº de pacientes	Porcentaje
6 – 11	30	23%
12 – 23	45	34%
24 – 35	19	14%
36 – 47	19	14%
48 – 59	20	15%

Tabla 5. Distribución de la población de estudio en función de las edades.

Los valores de la hemoglobina (Hb) y del hematocrito (Hto) del niño se midieron de nuevo el día 14 del estudio cuando se encontraron por debajo de 8 g/dl ó 24% respectivamente, o cuando el médico lo solicitó.

Hb (g/dl)	D0 (133)	D14 (28)	Hto (%)	D0 (123)	D14 (18)
<5	0 (0%)	0 (0%)	<15	0 (0%)	0 (0%)
5-7,9	30 (23%)	1 (3,5%)	15-24	12 (9.5%)	0 (0%)
8-9,9	55 (41%)	12 (43%)	25-29	34 (28%)	4 (22%)
10-12	43 (32%)	15 (53,5%)	30-35	65 (53%)	12 (67%)
>12	5 (4%)	0 (0%)	>=36	12 (9.5%)	2 (11%)

Tabla 6. Valores de hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hto) de la población estudiada, indicando el nivel de cada uno de los parámetros en el día 0 (D0) y en el día 14 (D14) del estudio. El nº que aparece entre paréntesis en cada uno de los días de estudio se corresponde con el nº de pacientes estudiado.

Parasitemia (parásitos / ml)	Número	Porcentaje
2.000 – 9.999	45	34%
10.000 – 19.999	44	33%
> = 20.000	44	33%

Tabla 7. Parasitemia determinada en la población estudiada.

4.1.1.2. Evolución de la infección tras el tratamiento

En las figuras de 11 a 13 se puede observar como se ha aclarado la parasitemia con cada uno de los diferentes antipalúdicos que se utilizaron en el estudio, en los casos en los que se produjo Respuesta Clínica Adecuada (RCA).

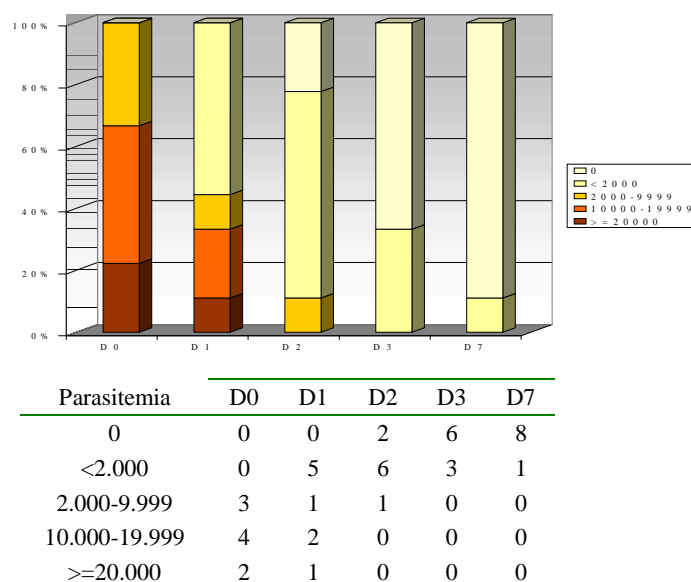


Figura 11. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con cloroquina.

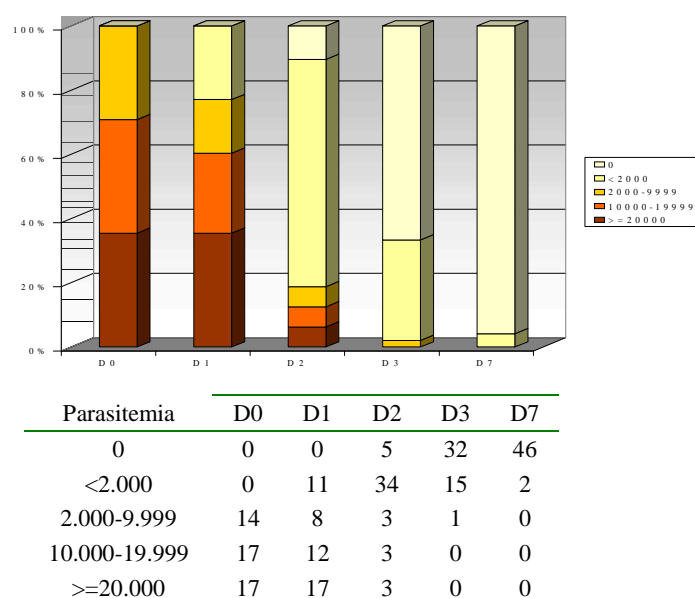
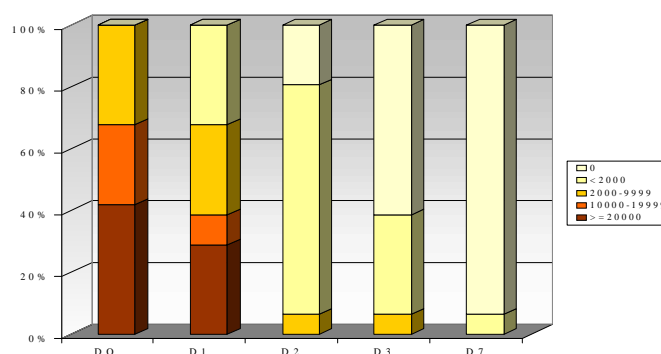


Figura 12. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con S/P



Parasitemia	D0	D1	D2	D3	D7
0	0	0	6	19	29
<2000	0	10	23	10	2
2000-9999	10	9	2	2	0
10000-19999	8	3	0	0	0
>=20000	13	9	0	0	0

Figura 13. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con quinina

En ninguno de los grupos de estudio (cloroquina, S/P y quinina) se detectaron diferencias en el aclaramiento parasitario cuando se trataba de Respuesta Clínica Adecuada (Figura 14).

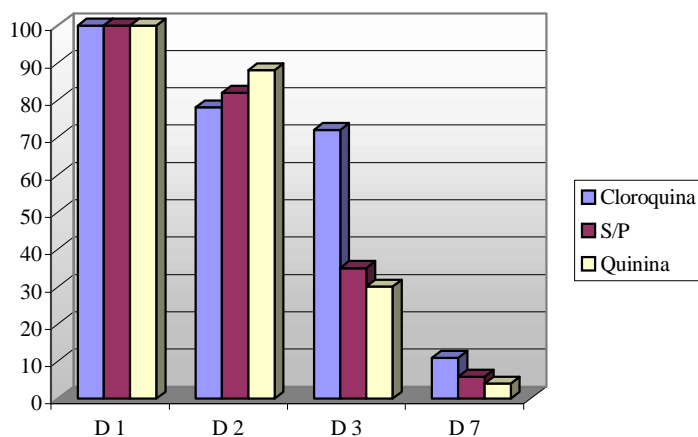


Figura 14. Proporción de niños con parasitemia asexual de *P. falciparum* en cada uno de los grupos de tratamiento en función de los días de estudio en los que se tomó la muestra.

La respuesta a los distintos tratamientos se clasificó en tres grupos distintos: Fracaso Terapéutico Precoz, Fracaso Terapéutico Tardío y Respuesta Clínica Adecuada (ver Materiales y Método, pag. 19). La distribución de los niños según los medicamentos administrados y la respuesta al tratamiento aparece reflejada en la tabla 8.

Tratamientos	Nº niños	FTP	FTT	RCA
Cloroquina	22	7 (32%)	6 (27%)	9 (41%)
S/P	45	2 (4%)	9 (20%)	34 (76%)
Quinina	66	0 (0%)	14 (21%)	52 (79%)
TOTAL	133	9 (6,8%)	29 (21,8%)	95 (71,4%)

Tabla 8. Distribución según medicamentos administrados y respuesta al tratamiento. **FTP:** Fracaso terapéutico precoz. **FTT:** Fracaso terapéutico tardío. **RCA:** Respuesta clínica adecuada.

La administración de cloroquina y S/P se realizó de manera directamente observada por el equipo del Proyecto Control del Paludismo. La quinina se administró siempre a niños ingresados en el hospital e inicialmente por vía intravenosa. La supervisión de la dosis y la frecuencia del tratamiento estaba a cargo del personal de Pabellón Infantil. En algunos casos no se pudo constatar una correcta administración del medicamento.

Un factor adicional a tener en cuenta a la hora de valorar los resultados de eficacia terapéutica, es la imposibilidad de distinguir en el terreno los fracasos terapéuticos tardíos de más de 7 días de las reinfecciones en el momento de la realización del estudio. En el caso de las reinfecciones, obviamente, no se trataría de una resistencia al medicamento. La diferenciación entre resistencia y reinfección se puede realizar por métodos moleculares, como veremos más adelante.

4.1.2 ESTUDIO DE EFICACIA TERAPÉUTICA REALIZADO EN EL AÑO 2001

Este estudio (de enero hasta diciembre de 2001) se comenzó con 339 niños que cumplían los criterios establecidos para la realización del estudio (ver Material y Método, pag. 15). De ellos 136 que acudieron a las consultas externas del Pabellón Infantil del Hospital Regional de Malabo y 203 al Hospital Regional de Bata. Del total de 339 niños finalizaron el estudio (al menos 7 días) 96 niños en Malabo (todos ellos tratados con quinina) y 156 en Bata, 45 incluidos en el grupo de la cloroquina, 36 en el del S/P y 75 en el de la quinina. Las causas más frecuentes de abandono del estudio fueron las anteriormente mencionadas (ver apartado 4.1.1, pag. 26). Durante el periodo de tiempo que duró el estudio se registraron dos defunciones.

4.1.2.1. Características de los niños incluidos en el estudio

Al igual que en el caso del estudio realizado en el año 1999 se tomaron una serie de datos de los niños incluidos, como características generales (edad y peso), aspectos clínicos (temperatura, hemoglobina, hematocrito) y parasitológicos (parasitemia, tasa de gametocitemia). Se calcularon las medias de estos valores para los cuatro grupos de estudio (Tabla 9).

	Malabo	Bata		
	Quinina	Cloroquina	S/P	Quinina
Edad media (meses)	24	23	27	17
Peso medio (Kg)	11,4 (4,2-22)	10,9 (5,1-18,5)	11,9 (4,6-18)	10 (5-22)
Temperatura media (°C)*	37,4 (35-40)	37,8 (36-40,1)	37,4 (35,8-39,6)	37,8 (36-40,5)
Fiebre *	34 (35%)	25 (55,5%)	16 (44,4%)	45 (60%)
Hemoglobina media*	9,2 (4,4-13)	9 (6,5-12)	8,8 (4-12)	7,9 (4-12,5)
Hematocrito medio*	29,5 (11-45)	28 (20-39)	29 (20-38)	25 (10-38)
Parasitemia media /µl *	27.644 (20.00-200.000)	25.538 (2.000-137.920)	15.278 (2.000-64.680)	24.165 (2.000-200.000)
Tasa de gametocitemia*	5%	0	3%	3%

Tabla 9. Características iniciales de los niños incluidos en el estudio. * Datos tomados en el momento de la admisión.

Se puede observar que la temperatura medida en el momento de la admisión en un gran número de niños era inferior a 37,5°C (valor tomado como criterio de inclusión por la OMS). Como en el estudio anterior, este dato no se tuvo en cuenta a la hora de incluir al niño en el estudio, ya que en muchas ocasiones se valoró el dato por la madre haciendo referencia a la temperatura del niño la tarde anterior u horas antes de la admisión.

Otro de los parámetros determinados fue la glucemia capilar, detectándose 2 casos en Malabo (1,5%) y 9 (5%) en Bata que presentaban un nivel inferior a 60 mg/dl, en ningún caso por debajo de 40 mg/dl, que es el límite tomado como referencia de paludismo complicado por la OMS (ver Material y Método pag 16).

Algunas características de la población, que se consideran más relevantes en el estudio, como la edad, hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), parasitemia y gametocitemia aparecen reflejadas en las tablas 10, 11, 12 y 13

Edad (meses)	Malabo		Bata	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
6 – 11	24	18%	63	31%
12 – 23	64	47%	76	38%
24 – 35	22	16%	25	12%
36 – 47	14	10%	22	11%
48 – 59	12	9%	17	8%

Tabla 10. Distribución de la población de estudio en función de las edades.

Los valores de la hemoglobina y hematocrito se tomaban en el D0 y también en el día 14 del estudio cuando se encontraron en el D0 por debajo de 8 g/dl ó 24% respectivamente o cuando el médico lo solicitó.

Hb (g/dl)	Malabo		Bata	
	D0 (136)	D14 (8)	D0 (203)	D14 (50)
<5	4 (3%)	0 (0%)	8 (4%)	0 (0%)
5-7,9	23 (17%)	0 (0%)	64 (31,5%)	2 (4%)
8-9,9	50 (37%)	2 (25%)	76 (37,5%)	33 (66%)
10-12	46 (34%)	3 (37,5%)	53 (26%)	15 (30%)
>12	13 (9%)	3 (37,5%)	2 (1%)	0 (0%)

Tabla 11. Valores de hemoglobina (Hb) de la población estudiada, indicando los detectados en cada zona de estudio así como en el día en el que se midió, día 0 (D0) y día 14 (D14).

Hto (%)	Malabo		Bata	
	D0 (135)	D14 (42)	D0 (182)	D14 (43)
<15	2 (1,5%)	0 (0%)	3 (1,5%)	0 (0%)
15-24	15 (11%)	0 (0%)	51 (28%)	0 (0%)
25-29	53 (39,5%)	11 (26%)	56 (31%)	18 (42%)
30-35	42 (31%)	21 (50%)	62 (34%)	22 (51%)
>=36	23 (17%)	10 (24%)	10 (5,5%)	3 (7%)

Tabla 12. Valores de hematocrito (Hto) de la población estudiada, indicando los detectados en cada área de estudio así como en el día en el que se midió, día 0 (D0) y día 14 (D14).

Parasitemia (parasitos / μl)	Malabo		Bata	
	Número (136)	Porcentaje	Número (203)	Porcentaje
2.000 – 9.999	51	37,5%	64	31,5%
10.000 – 19.999	29	21,5%	76	37,5%
> = 20.000	56	41%	63	31%

Tabla 13. Parasitemia detectada en la población en cada área de estudio.

Durante el estudio realizado en el 2001 se recogió un dato parasitológico que no se había tomado en el estudio realizado en el año 1999, la gametocitemia. Se determinó ese dato en los pacientes en el día 0, el 7 (por encontrarse en este día el pico de prevalencia) y el día 14 (Tabla 14). No se observaron diferencias significativas entre los niveles de gametocitemias en ninguno de los días en cada uno de los tres grupos terapéuticos.

	Malabo		Bata	
Gametocitemia	Quinina	Cloroquina	S/P	Quinina
Día 0	4 (5%)	0	1 (3%)	2 (3%)
Día 7	22 (35%)	14 (36%)	18 (51%)	19 (25%)
Día 14	8 (16%)	5 (17%)	9 (29%)	10 (18%)

Tabla 14. Datos de la gametocitemia para cada población de estudio (Malabo y Bata), indicando el día en el que se calculó la gametocitemia, así como el antipalúdico empleado en cada caso.

4.1.2.2 Evolución de la infección tras el tratamiento

En las figuras 15 a 18 aparece indicado el aclaramiento de la parasitemia con cada uno de los diferentes antipalúdicos que se utilizaron en el estudio, en los casos en los que se produjo Respuesta Clínica Adecuada (RCA).

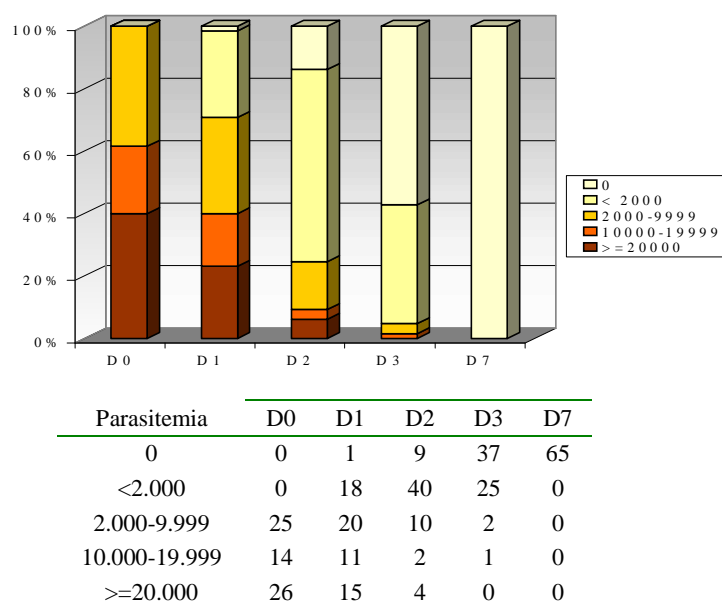


Figura 15. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con quinina (Hospital Regional Malabo)

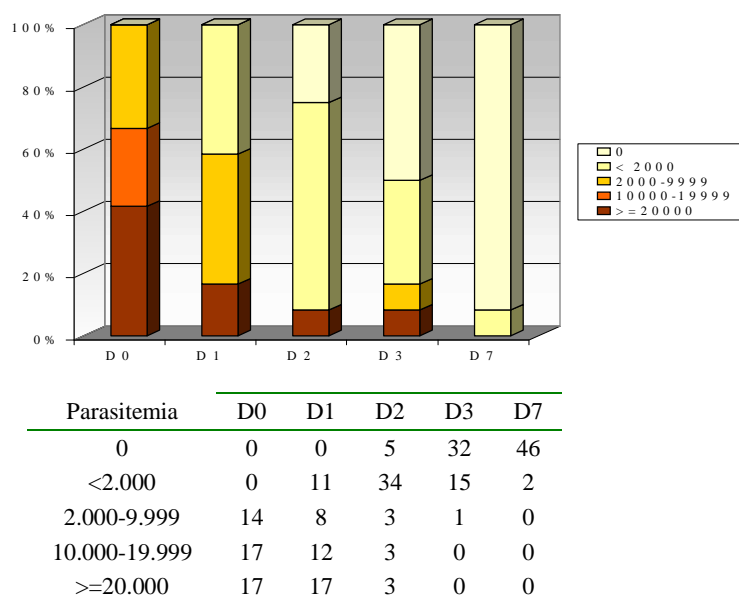


Figura 16. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con cloroquina (Hospital Regional Bata)

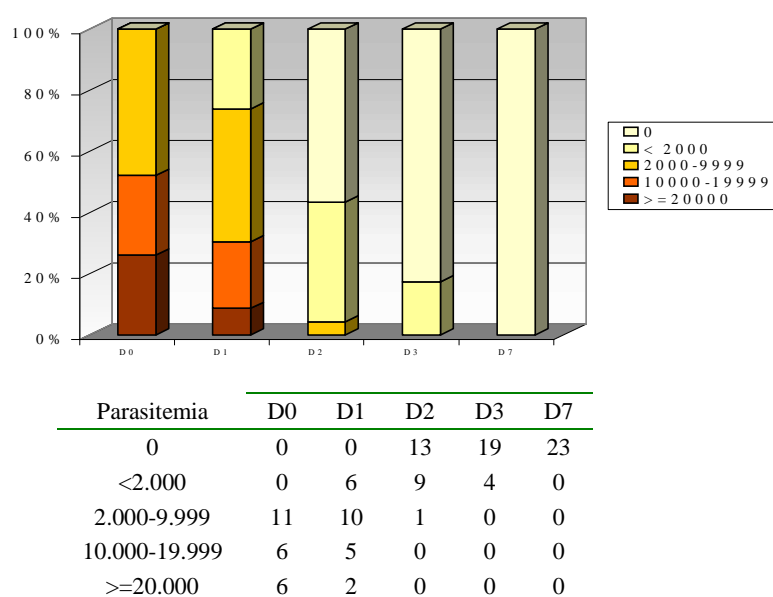


Figura 17. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con S/P (Hospital Regional Bata)

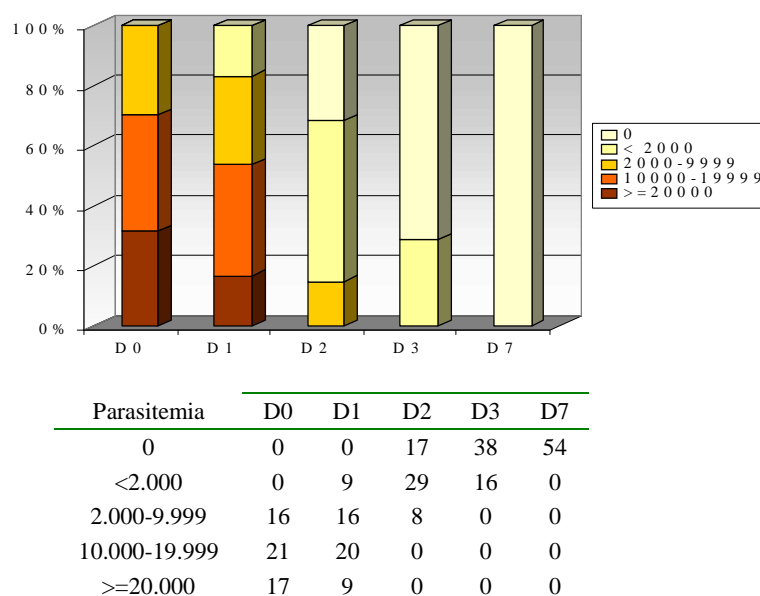


Figura 18. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con quinina (Hospital Regional Bata)

En los casos en los que se produjo Respuesta Clínica Adecuada, se observa que el aclaramiento fue similar en los cuatro grupos incluidos en el estudio (cloroquina, S/P, quinina en Bata y quinina en Malabo) no detectándose diferencias significativas entre ellos (Figura 19).

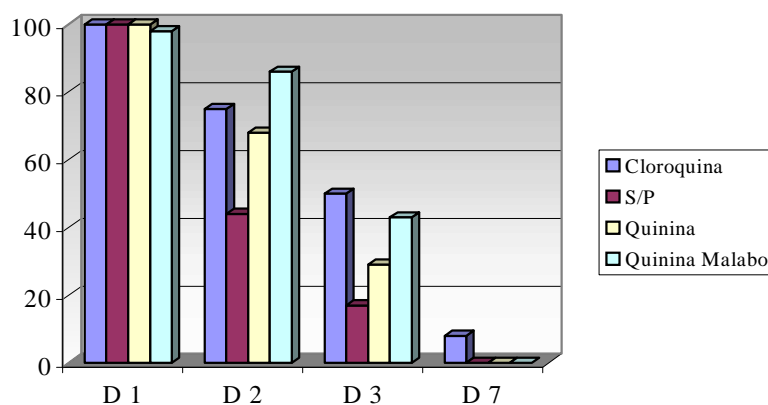


Figura 19. Porcentaje de niños con parasitemia asexual de *P. falciparum* en cada uno de los grupos de tratamiento en función de los días de estudio en los que se tomó la muestra.

Como ya se ha indicado anteriormente la respuesta que presentaron los pacientes a los distintos tratamientos se clasificaron en FTP, FTT y RCA. La distribución de los niños de los diferentes estudios según los medicamentos administrados así como la respuesta al tratamiento, aparece reflejada en la tabla 15.

Malabo				
	N° niños	FTP	FTT	RCA
Quinina	96	0 (0%)	31 (32%)	65 (68%)
Bata				
	N° niños	FTP	FTT	RCA
Cloroquina	45	15 (33%)	18 (40%)	12 (27%)
S/P	36	6 (17%)	7 (19%)	23 (64%)
Quinina	75	1 (1%)	20 (27%)	54 (72%)
TOTAL	156	22 (14%)	45 (29%)	89 (57%)

Tabla 15. Distribución según el medicamento administrado y la respuesta detectada al tratamiento. **FTP:** Fracaso terapéutico precoz. **FTT:** Fracaso terapéutico tardío. **RCA:** Respuesta clínica adecuada.

Al igual que el estudio del año 1999, la administración de la cloroquina y S/P a los niños incluidos en el estudio estuvo directamente observada por el personal del proyecto “Control del Paludismo en Guinea Ecuatorial”. La quinina se administró siempre a niños ingresados en el hospital e inicialmente por vía intravenosa, y la supervisión de la dosis y la frecuencia del tratamiento era responsabilidad del personal del Pabellón Infantil. Por tanto aquí se aplican las mismas precauciones que las citadas en el estudio anterior (pag. 30) a la hora de valorar el resultado de la eficacia terapéutica de la quinina.

4.1.3. ESTUDIO DE EFICACIA TERAPÉUTICA REALIZADO EL AÑO 2002

El estudio se inició con un total de 288 niños, pero sólo 206 completaron el estudio al menos 14 días, 95 en el grupo de la sulfadoxina/pirimetamina (S/P) y 111 en el grupo de S/P más artesunato (S/P-A). Las razones por las que abandonaron el estudio fueron las mencionadas anteriormente (ver pag. 26). Durante el tiempo que duró el estudio no se registró ningún fallecimiento.

4.1.3.1 Características de los niños incluidos en el estudio

En la tabla 16 observamos la distribución por edades de la población que entró a formar parte del estudio.

Edad (meses)	Número	Porcentaje
6 – 11	39	18,9%
12 – 23	62	30,1%
24 – 35	46	22,3%
36 – 47	38	18,5%
48 – 59	21	10,2%

Tabla 16. Distribución de la población de estudio en función de la edad.

Como en los casos anteriores se recogieron las características generales de los niños, aspectos clínicos y aspectos parasitológicos. Calculamos las medias que aparecen reflejadas en la tabla 17, clasificadas según el grupo terapéutico al que pertenecían.

	S/P (n=95)	S/P-A (n=111)
Edad media (meses)	25 (6-59)	25,5 (6-59)
Peso medio (Kg)	11,5 (6-20)	10,4 (6-22)
Temperatura media (°C)*	36,5 (35,1-39)	36,8 (35,1-40)
Fiebre *	13 (13,8%)	33 (29,7%)
Días de fiebre antes de la admisión	3 (1-4)	3 (1-4)
Hematocrito medio*	28 (16-36)	28 (15-45)
Parasitemia media /µl *	19.700 (2.000-200.000)	19.600 (1.280-200.000)
Tasa de gametocitemia*	5,3%	7,2%

Tabla 17. Características iniciales de los niños incluidos en el estudio. * Datos tomados durante la admisión. S/P: sulfadoxina /pirimetamina; S/P –A: sulfadoxina /pirimetamina -artesunato.

En las tablas 18 y 19 aparecen más detalladas algunas de las características clínicas de la población como son los datos de hematocrito así como las parasitemias en cada uno de los grupos.

	S/P		S/P-A	
Hto (%)	D0 (95)	D14 (90)	D0 (111)	D14 (96)
<15	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
15-24	22 (24%)	4 (4%)	23 (21%)	11 (11%)
25-29	41 (42%)	28 (31%)	43 (39%)	28 (29%)
30-35	31 (33%)	48 (54%)	41 (37%)	48 (50%)
>=36	1 (1%)	10 (11%)	4 (3%)	10 (10%)

Tabla 18. Valores de hematocrito (Hto) de población estudiada distribuidos en función del tratamiento empleado y los días de toma de muestra, día 0 (D0) y día 14 (D14).

Parasitemia (parasitos / ml)	Número	Porcentaje
2.000 – 9.999	63	30,9%
10.000 – 19.999	41	20,1%
> = 20.000	100	49,0%

Tabla 19. Parasitemia detectada en la población estudiada

4.1.3.2. Evolución de la infección tras el tratamiento

En las figuras 20 y 21 se puede observar el aclaramiento de la parasitemia en cada uno de los grupos de tratamiento del estudio, en los casos en los que se produjo Respuesta Clínica Adecuada (RCA).

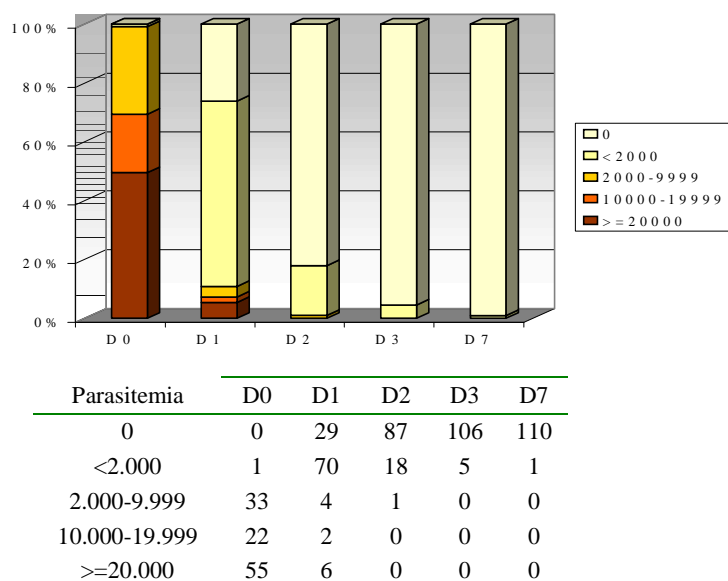


Figura 20. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con S/P-A los primeros 7 días.

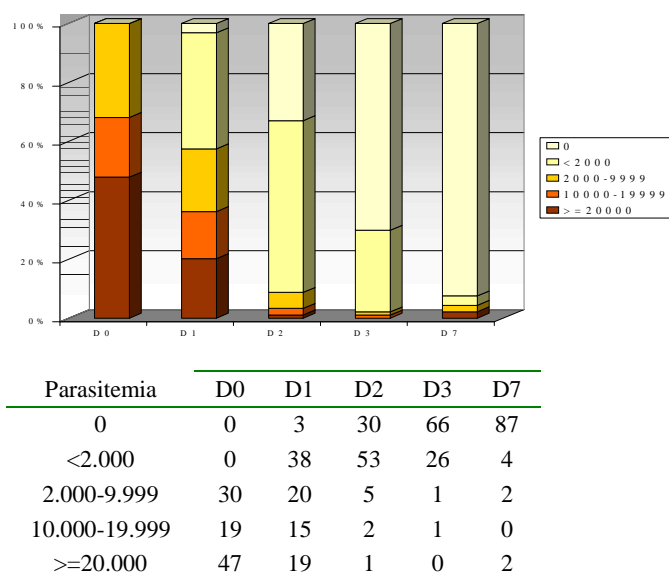


Figura 21. Evolución de la parasitemia en los casos de RCA tratados con S/P los primeros 7 días.

En los casos en los que se obtuvo una respuesta clínica adecuada, el aclaramiento parasitario fue significativamente más rápido en los niños del grupo S/P-A que en los del grupo S/P ($p < 0,001$) (figura 22). En el grupo S/P solo 3 niños de 95 (3,1%) habían aclarado la parasitemia en el día 1, mientras que en el grupo del artesunato fueron 29 de 111 (26,1%). El día 2, 30 de 91 (33%) habían aclarado su parasitemia en el grupo S/P, comparado con 87 de 106 (82,1%) en el otro grupo. El día 3 sólo 5 niños de 111 (4,5%) presentaban parasitemia detectable en el grupo del artesunato comparado con 28 de 94 (30%) en el de S/P.

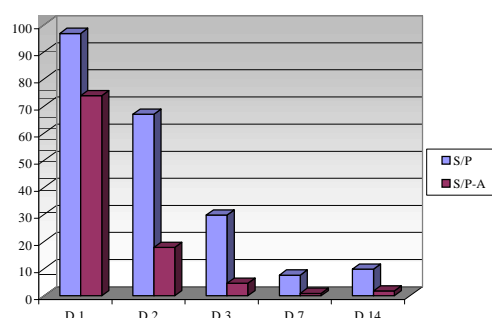


Figura 22. Porcentaje de niños con parasitemia asexual de *P. falciparum* en cada uno de los grupos de tratamiento en función de los días de estudio en los que se tomó la muestra.

La respuesta terapéutica a las combinaciones sulfadoxina/pirimetamina (S/P) y S/P más artesunato (S/P-A) durante los 14 días de seguimiento fue clasificada como se indica en la pag. 30.

Los resultados obtenidos en cada grupo terapéutico aparecen en la tabla 20. La tasa de fracasos (refiriéndonos como tal a la suma de FTT más FTP) con S/P fue del 17,9% mientras que con S/P-A fue del 0,9%. Esa diferencia resulta significativa ($p < 0,001$). Once niños del grupo S/P, que previamente habían aclarado su parasitemia, volvieron con un segundo episodio antes del día 14, recibiendo tratamiento de rescate con quinina.

	S/P (n=95)	S/P-A (n=111)
RCA	78 (82,1%)	110 (99,1%)
FTP	6 (6,3%)	1 (0,9%)
FTT	11 (11,6%)	0

Tabla 20. Respuesta terapéutica en los dos grupos de tratamiento (S/P y S/P-A)

En el momento de la admisión el 29,7% de los niños del grupo de S/P-A tenían fiebre ($T^a \geq 37,5$) mientras que en el grupo S/P solamente se detectó en el 13,8% ($p < 0,05$). Es decir los grupos no fueron homogéneos al inicio con respecto a la fiebre, siendo ésta mayor en el del artesunato. En cambio el día 1 sólo un niño (0,9%) tuvo fiebre en el grupo del artesunato en comparación con siete (7,3%) en el otro grupo ($p < 0,05$). La remisión de la fiebre es significativamente más rápida en el grupo S/P-A.

Respecto a la gametocitemia (figura 23), ésta fue positiva en el momento de la admisión en 5 (5,3%) y 8 (7,2%) niños en los grupos S/P y S/P-A respectivamente. Esta diferencia no resultó significativa. El día 7 tenían gametocitemia 7 (6,4%) niños en el grupo S/P-A y 31 (33,7%) en el grupo S/P ($p < 0,001$). La diferencia del día 14 también resultó significativa: 7 (6,4%) en el grupo del artesunato y 24 (26,1%) en el del S/P.

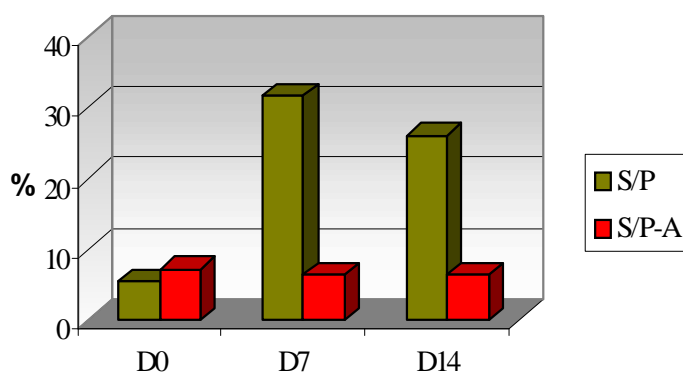


Figura 23. Proporción de niños con parasitemia sexual de *P. falciparum* en cada uno de los grupos de tratamiento en función de los días de estudio.

El grupo del artesunato se mostró más eficaz en su respuesta terapéutica. Además si observamos la remisión de la fiebre así como el aclaramiento de la gametocitemia, son más rápidos en el grupo de artesunato que en el del S/P.

4.2. ESTUDIO DE LOS GENES *msp-1* y *msp-2* DE *Plasmodium falciparum*

4.2.1 DIFERENCIACIÓN ENTRE RECAIDAS Y NUEVAS INFECCIONES

Durante el estudio *in vivo* del año 1999, 29 pacientes fueron clasificados por criterios clínicos y parasitológicos como fracaso terapéutico tardío (FTT), es decir el que se detecta después del día 7 tras el inicio del tratamiento (ver Materiales y Método, pag.30). De éstos, 6 fueron tratados con cloroquina, 9 con sulfadoxina/pirimetamina (S/P) y 14 con quinina.

Dada las características endémicas de la paludismo en el país, se decidió diferenciar mediante PCR de los genes *msp-1* y *msp-2* los casos en los que se producía una verdadera resistencia de aquellos en los que se trataba de una reinfección. Se analizaron 29 pares de muestras (denominándose dichas muestras como O para el día de inicio y R para el día de la reaparición de los parásitos). En total se amplificaron 27 pares de muestras para ambos genes. En dos pares no se obtuvo amplificación en alguno de los dos genes: una muestra R no se pudo amplificar para *msp-1* y otra muestra R para *msp-2*.

Tras el estudio de las tres familias alélicas en las que se encuentra dividido el gen *msp-1* se detectaron 20 tamaños alélicos diferentes: 11 de la familia K1, 8 de MAD20 y 1 de R033. Del gen *msp-2* se encontraron 9 alelos diferentes. En este caso no se estudiaron las dos familias alélicas, sino que se realizó un estudio global de gen.

Los alelos detectados con más frecuencia para el gen *msp-2* fueron Mp600 (38,5%) y Mp500 (29,2%), y para el gen *msp-1* fue el R033-150 (25,5%).

Los alelos de *msp-1* y 2 encontrados en las muestras O y R de los 29 niños se muestran en las tablas 21 (tratados con cloroquina), 22 (tratados con S/P) y 23 (tratados con quinina).

GRUPO DE TRATAMIENTO CON CLOROQUINA						
Nº aislado		Alelos de MSP-1		Alelos MSP-2	MOI	Definición
		Secuencia	Tamaño (pb)			
5	Día 0	K1	175	600	1	NI
	Día 28	K1	150		1	
19	Día 0	K1	225	600		R (mixto)
		MAD20	200		3	
		RO33	150			
	Día 21	RO33	150	600	1	
20	Día 0	MAD20	200	500	2	NI
		RO33	150			
	Día 21	MAD20	200	600	2	
		RO33	150			
28	Día 0	K1	225	550	1	NI
	Día 28	RO33	150	550 650	2	
73	Día 0	RO33	150	500	1	R
	Día 14	RO33	150	500	1	
74	Día 0	K1	175	700	1	NI+R
	Día 21	K1	175	700	2	
		RO33	150			

Tabla 21. Frecuencia de las diferentes familias alélicas de los genes *msp-1* y *msp-2* de *P. falciparum* en niños tratados con cloroquina. *NI= Nueva infección; R= Recrudescencia; (mixto) = parásitos originales resistentes y sensibles; MOI = Índice de infección múltiple.

GRUPO TRATADO CON SULFADOXINA / PIRIMETAMINA						
Nº aislado		Alelos de MSP-1		Alelos MSP-2	MOI	Definición*
		Secuencia	Tamaño (pb)			
14	Día 0	K1	225	750		R (mixto)
		MAD20	200	500	3	
		RO33	150			
	Día 21	K1	225	500		
		MAD20	200		3	
		RO33	150			
65	Día 0	K1	225	600	1	NI
	Día 28	K1	225	600		
		MAD20	200		3	
		RO33	150			

Tabla 22(a). Frecuencia de las diferentes familias alélicas de los genes *msp-1* y *msp-2* del *P. falciparum* en niños tratados con S/P. *NI= Nueva infección; R= Recrudescencia; (mixto) = parásitos originales resistentes y sensibles. MOI = Índice de infección múltiple.

GRUPO TRATADO CON SULFADOXINA / PIRIMETAMINA					
N° aislado	Alelos de MSP-1		Alelos MSP-2	MOI	Definición*
	Secuencia	Tamaño (pb)			
82	Día 0	K1	175		
			150	3	R
		RO33	150		(mixto)
	Día 21	K1	150	600	1
94	Día 0	K1	300	550	
			200	3	
		RO33	150		NI+R
	Día 28	K1	300	550	
			200	3	
		MAD20	400		
95	Día 0	K1	300	600	
			200	3	R
		RO33	150		(mixto)
	Día 21	K1	300	600	
			200	2	
107	Día 0	K1	325	650	
			275	550	
			175	5	
		MAD20	175		NI+R
		RO33	150		
	Día 21	K1	275	550	
			175	4	
		MAD20	150		
126	Día 0	K1	450	550	
			400		
			225	6	
			150		NI+R
		MAD20	175		
		RO33	150		
	Día 28	K1	225	550	
			150	2	
160	Día 0	K1	300	500	
			225	3	NI
		RO33	150		
	Día 14	K1	225	600	1
249	Día 0	K1	150	600	2
	Día 28			600	1
					(mixto)

Tabla 22(b). Frecuencia de las diferentes familias alélicas de los genes *msh-1* y *msh-2* del *P. falciparum* en niños tratados con S/P. *NI= Nueva infección; R= Recrudescencia; (mixto) = parásitos originales resistentes y sensibles. MOI = Índice de infección múltiple.

GRUPO TRATADO CON QUININA						
N° aislado	Alelos MSP-1		Alelos MSP-2	MOI	Definición*	
	Secuencia	Tamaño (pb)				
100	Día 0	K1	300	600	NI	
			200	3		
		MAD20	400			
	Día 28	MAD20	275	550		
		RO33	150	2		
131	Día 0	K1	300	550	NI	
			225	4		
		MAD20	175			
		RO33	150			
	Día 28	K1	250	500		
	MAD20	175	2			
145	Día 0	K1	300	500	R (mixto)	
			175	3		
		RO33	150			
	Día 21	K1	175	500		
		RO33	150	2		
154	Día 0	K1	200	750	R (mixto)	
			275	3		
		MAD20	225			
	Día 28	K1	200	750		
164	Día 0	K1	175	500	NI	
		MAD20	175	2		
	Día 14	K1	200	600		
170	Día 0	K1	250	600	NI+R	
		MAD20	200	3		
		RO33	150			
	Día 21	K1	500	600		
			250	425		
			175	5		
		MAD20	255			
		200				
199	Día 0	K1	200	500	1	NI
	Día 21	MAD20	225	600	2	
				500		
205	Día 0	K1	150	500	1	NI
	Día 7	K1	175	500		
		MAD20	175		3	
		RO33	150			

Tabla 23 (a). Frecuencia de las diferentes familias alélicas de los genes *msp-1* y *msp-2* del *P. falciparum* en niños tratados con quinina. *NI= Nueva infección; R= Recrudescencia; (mixto) = parásitos originales resistentes y sensibles. MOI = Índice de infección múltiple.

GRUPO TRATADO CON QUININA					
Nº aislado	Alelos MSP-1		Alelos MSP-2	MOI	Definición*
	Secuencia	Tamaño			
208	Día 0	K1	175	725	NI
		MAD20	225	500	
		RO33	150		
	Día 21	K1	175	600	1
212	Día 0	MAD20	175	500	NI
		RO33	150		
	Día 21	K1	325	500	1
213	Día 0	MAD20	300	500	NI
		RO33	150		
	Día 14	K1	325	500	1
243	Día 0	MAD20	300	600	NI
		RO33	150		
	Día 21	K1	150	600	
		RO33	150		
58	Día 0	K1	225	700	R (mixto)
		RO33	150	600	
	Día 28	K1	225	600	1
259	Día 0	K1	225	600	R (mixto)
				250	
	Día 21	K1	225	600	1

Tabla 23 (b). Frecuencia de las diferentes familias alélicas de los genes *msp-1* y *msp-2* del *P. falciparum* en niños tratados con quinina. *NI= Nueva infección; R= Recrudescencia; (mixto) = parásitos originales resistentes y sensibles. MOI = Índice de infección múltiple.

Del total de muestras analizadas, 19 (65,5%) de las muestras O y 14 (48%) de las muestras R presentaron dos o más alelos y eran por tanto infecciones mixtas de *Plasmodium falciparum*. En las muestras O, aparecieron 8 con 2 parásitos, 9 con 3, una con 4 y una con 6. En el caso de las muestras R, 9 tenían 2 parásitos, 3 muestras 3 parásitos, una 4 parásitos y otra 5 parásitos.

El número mínimo de diferentes poblaciones de *Plasmodium falciparum* encontrados en una muestra (índice de infección múltiple o MOI) se corresponde con el mayor número de alelos de *msp-1* o *msp-2* encontrados en dicha muestra. En este caso varía de 1 a 6 antes del tratamiento y de 1 a 5 después del mismo. La media de diferentes poblaciones de parásitos en este estudio fue 2,38 y 1,90, antes y después del tratamiento respectivamente. Ni el MOI ni la media presentaron una diferencia significativa antes y después del tratamiento. Aunque esta muestra es pequeña ya se puede observar que existe una gran variabilidad poblacional de *P. falciparum* en el área de realización del estudio. Esto, como se verá más adelante, se confirma con la ampliación de la muestra.

Se analizaron los datos obtenidos con la finalidad de discernir los casos de auténtica resistencia de las reinfecciones. Los resultados fueron que 10 niños (34%) presentaban auténtica recrudescencia, es decir, presentaron los mismos alelos en las muestras O y R. En 14 niños (48%) la parasitemia detectada reflejaba

una nueva infección. En 5 pacientes (18%) se encontraron ambos patrones (de resistencia y reinfección) ya que la muestra R presentó los mismos alelos que la O junto con otros adicionales. En la tabla 24 se muestra la distribución de las recaídas y reinfecciones según los diferentes medicamentos.

	Nº niños	Recrudescencias	Recrudescencias y reinfecciones	Reinfecciones
Cloroquina	6	2	1	3
S/P	9	4	3	2
Quinina	14	4	1	9
Total	29	10 (34%)	5 (18%)	14 (48%)

Tabla 24. Distribución de las recaídas y reinfecciones según los diferentes medicamentos.

De los 15 niños con recrudescencia (10 con auténtica recrudescencia y 5 con recrudescencia más una nueva infección), 3 habían recibido cloroquina (50%), 7 S/P (78%) y 5 quinina (35%). De los 19 niños con nuevas infecciones, 4 (66%) habían recibido cloroquina, 5 (55%) S/P y 10 (71%) quinina. Con estos nuevos datos, las tasas de resistencia a estos antipalúdicos para el año 1999, variaron de manera significativa con respecto a las obtenidas por estudios clínicos. La quinina pasó de un 21% al 8% ($p<0,05$) y la cloroquina del 59% al 45% ($p<0,05$). Las diferencias no fueron significativas en el caso de S/P.

Si tenemos en cuenta el día en que se detecta la nueva parasitemia, de los 5 casos en que reaparecieron parásitos en las dos primeras semanas, sólo uno fue una recaída, siendo las otras cuatro nuevas infecciones. En los 24 casos en los que se detectaron parásitos después del día 14, 10 de ellos (41,7%) fueron nuevas infecciones, 9 (37,5%) recaídas y 4 (20,8%) fueron mixtas, recaída y reinfección.

4.2.2 MULTIPLICIDAD

Para llevar a cabo tanto el estudio de multiplicidad como de variabilidad genética se utilizaron muestras de un total de 409 niños que formaron parte de los estudios de eficacia terapéutica. De ellos 221 eran de Malabo (130 del año 1999 y 91 del 2001) y 188 de Bata (todos del año 2001). Se realizó el análisis de las 409 muestras mediante PCR para los genes de *msp-1* y *msp-2*, pero sólo se obtuvo amplificación en 408 muestras para *msp-1* y en 385 para *msp-2*. Se incluyeron las 409 muestras en el estudio, ya que todas presentaron amplificación bien para *msp-1*, para *msp-2* o para los dos.

De los 409 niños incluidos en el estudio, 197 (43,2%) eran niños y 212 (51,8%) niñas, todos ellos entre 6 meses y 5 años de edad (Tabla 25).

Edad (meses)	Nº
6-11	106
12-23	152
24-35	56
36-47	50
48-59	45

Tabla 25. Distribución de la población de estudio en grupos de edad

A todos los niños se les administró el antipalúdico correspondiente al grupo de estudio de la eficacia terapéutica al que pertenecían y se les hizo un seguimiento para comprobar la respuesta a dicho tratamiento. En 222 casos hubo una respuesta clínica adecuada, 128 fueron resistentes, de los que 99 tuvieron un fracaso terapéutico tardío y 29 precoz. No se pudo completar el seguimiento en 59 de los casos.

Al inicio del estudio de eficacia terapéutica del año 2001, tanto en Malabo como en Bata, los niños se distribuyeron según su clínica en casos complicados (29) y no complicados (250). En el grupo de los casos complicados se incluyeron aquellos que presentaban algún criterio de inclusión según la definición de la OMS (WHO, 1996). Las complicaciones encontradas con más frecuencia fueron la anemia (56,3%) y la hiperparasitemia (19%).

Para describir la multiplicidad (definiéndose como tal la presencia de más de una población de *P. falciparum* en una muestra clínica) y comparar los diferentes grupos de población estudiados se utilizaron tres indicadores: 1) el porcentaje de muestras con infección múltiple, 2) la media estimada de parásitos por muestra y 3) el número máximo de parásitos encontrados en una muestra.

1) Porcentaje de muestras con infección múltiple. El indicador que nos permite conocer cuando existe multiplicidad de infección es el parámetro denominado MOI (multiplicidad de infección), de tal manera que una muestra con un $MOI > 1$ nos indica que hay al menos dos poblaciones de parásitos diferentes en dicha muestra; si el MOI es igual a 1 estamos frente a una muestra con una sola población.

En todo el estudio encontramos 361 (90,2%) muestras con $MOI > 1$, teniendo en cuenta los genes por separado aparece un $MOI > 1$ en 327 muestras (80%) para *msp-1* y 231 (56,5%) para *msp-2*. En la tabla 26 detallamos la multiplicidad de las diferentes poblaciones según las variables estudiadas (tiempo, geografía, gravedad de la infección y sensibilidad a los antipalúdicos).

La multiplicidad para *msp-1* de las muestras de Malabo 2001 es significativamente mayor que la de Malabo 1999; aparecen con un MOI mayor que uno el 82,4% en 2001 frente al 69% en 1999. Al comparar Malabo y Bata 2001 no hay diferencia significativa en la multiplicidad en ninguno de los casos. Si comparamos los datos obtenidos en Malabo 1999 y Bata 2001, la diferencia sí es significativa tanto para el MOI general como para *msp-1*. Se decidió comparar Malabo 1999 y Bata 2001 para ver diferencias geográficas, porque en ese momento ambas ciudades tenían una situación de endemidad y transmisión de la paludismo similar, ya que no se habían tomado en ninguna de las ciudades medidas de control contra la paludismo que fueran efectivas. Si en la comparación de los diferentes grupos poblacionales tenemos en cuenta la influencia que pueden tener las demás variables (regresión logística multivariante) las diferencias geográficas se mantienen y además se observan diferencias entre los años 1999 y 2001 en Malabo ($p < 0,05$) para el MOI general.

	MOI general			MOI <i>msp-1</i>			MOI <i>msp-2</i>		
	= 1	>1	p	= 1	>1	p	= 1	>1	p
Malabo	21	109	0,11	40	89	< 0,05 (0,024)	49	70	0,96
1999	(16,2%)	(83,8%)		(31%)	(69%)		(41,2%)	(58,8%)	
Malabo	8	83	0,36	16	75	0,34	34	48	0,70
2001	(8,8%)	(91,2%)		(17,6%)	(82,4%)		(41,5%)	(58,5 %)	
Malabo	8	83	0,36	16	75	0,34	34	48	0,70
2001	(8,8%)	(91,2%)		(17,6%)	(82,4%)		(41,5%)	(58,5 %)	
Bata	11	177		25	163		71	111	
2001	(5,9%)	(94,1%)		(13,3%)	(86,7%)		(39%)	(60,1%)	
Malabo	21	109	<0,05 (0,0026)	40	89	<0,05 (0,0001)	49	70	0,70
1999	(16,2%)	(83,8%)		(31%)	(69%)		(41,2%)	(58,8%)	
Bata	11	177		25	163		71	111	
2001	(5,9%)	(94,1%)		(13,3%)	(86,7%)		(39%)	(60,1%)	
Complicado	1	31	0,7*	2	30	0,27*	7	24	<0,05 (0,04)
No complicado	(3,1%)	(96,9%)		(6,2%)	(93,8%)		(22,6%)	(77,4%)	
No complicado	18	229		39	208		98	137	
complicado	(7,3%)	(92,7%)		(15,8%)	(84,2%)		(41,7%)	(58,3%)	
Sensible	22	200	0,94	49	172	0,139	87	119	0,54
Resistente	(9,9%)	(90,1%)		(22,2%)	(77,8%)		(42,2%)	(57,8%)	
Resistente	13	115		20	108		47	74	
	(10,2%)	(89,8%)		(15,6%)	(84,4%)		(38,8%)	(61,2%)	

Tabla 26. Multiplicidad en las diferentes poblaciones estudiadas.* Se ha aplicado la corrección de Fisher por tener una celda con un valor <5.

Si comparamos las muestras analizadas de pacientes con paludismo complicado y no complicado (Tabla 26) encontramos diferencias significativas, siendo la multiplicidad para *msp-2* mayor en los complicados. Al realizar la regresión logística esta diferencia desaparece.

Teniendo en cuenta la densidad parasitaria en relación con la multiplicidad de infección, podemos observar que las 327 muestras con infección múltiple para *msp-1* tienen una densidad parasitaria media de 21.965 parásitos / μ l, mientras que las 81 muestras con un MOI =1 tienen una densidad parasitaria de 19.145 parásitos / μ l. En el caso de la multiplicidad de infección para *msp-2*, en las 222 muestras con MOI >1 la densidad parasitaria media fue de 23.034 parásitos / μ l, mientras que en los casos en los que aparecían infecciones únicas (154 muestras) fue de 24.547 parásitos / μ l. No hay diferencia significativa para ninguno de los genes (prueba no paramétrica por distribución no normal de Kolmogorov-Smirnov).

En nuestro trabajo también analizamos la posible influencia o relación que pudiera existir entre la edad de los niños y la multiplicidad de infección (Tabla 27).

Tras la realización del análisis de las diferencias de multiplicidad entre los cinco grupos de edad (regresión logística) no pudimos detectar ninguna diferencia significativa entre ellos.

Edad (meses)	N°	MOI		<i>msp-1</i>		<i>msp-2</i>	
		=1	>1	=1	>1	=1	>1
6-11	106	9 (8,5%)	97 (91,5%)	20 (18,9%)	86 (81,1%)	40 (40%)	60 (60%)
12-23	152	18 (11,8%)	134 (88,2%)	30 (19,7%)	122 (80,3%)	55 (38,7%)	87 (61,3%)
24-35	56	4 (7,1%)	52 (92,9%)	8 (14,3%)	48 (85,7%)	19 (35,9%)	34 (64,1%)
36-47	50	6 (12%)	44 (88%)	12 (24,5%)	37 (75,5%)	22 (45,8%)	26 (54,2%)
48-59	45	3 (6,7%)	42 (93,3%)	11 (24,4%)	34 (75,6%)	18 (42,8%)	24 (57,2%)

Tabla 27. Multiplicidad de infección y edad.

2) Media estimada de parásitos por muestra. Teniendo en cuenta el MOI general, esta media es 2,83. En el caso del gen *msp-1* es de 2,38 y para el gen *msp-2* de 2,04. La media de parásitos de los diferentes grupos poblacionales estudiados aparece detallada en la tabla 28.

	General		<i>msp-1</i>		<i>msp-2</i>	
	Media	P	Media	P	Media	P
Malabo 99	2,75	0,671	2,08	0,012	2,12	0,238
Malabo 01	2,55		2,38		1,68	
Malabo 01	2,55	0,003	2,38	0,073	1,68	0,072
Bata 01	3,04		2,59		2,16	
Malabo 99	2,75	0,017	2,08	0,00	2,12	0,571
Bata 01	3,04		2,59		2,16	
Complicado	3,66	0,001	2,78	0,040	3	0,001
No complicado	2,78		2,49		1,88	
Sensible	2,77	0,393	2,26	0,035	1,98	0,350
Resistente	2,88		2,52		2,09	

Tabla 28. Media estimada de parásitos por muestra en las diferentes poblaciones a estudio.

Las muestras recogidas en Malabo durante el año 2001 tuvieron una media de parásitos para *msp-1* superior a las muestras recogidas en 1999. La media de parásitos para el MOI general en las muestras recogidas en Bata en el año 2001 fue mayor que la de Malabo, tanto en el año 1999 como 2001. Para el *msp-1* fue mayor en Bata que en Malabo en el año 1999. Así mismo, los niños que sufrieron un episodio de paludismo complicado tuvieron una media de parásitos significativamente mayor que aquellos con un cuadro de paludismo no complicado, tanto para *msp-1* como para *msp-2*. Los pacientes con paludismo resistente también tuvieron mayor número de parásitos para *msp-1*.

Teniendo en cuenta la variable edad, expresada en meses (tabla 29), el pico de máxima multiplicidad lo hayamos en el grupo de 24 a 35 meses, aunque no hubo diferencias significativas (Kruskal Wallis) entre

los grupos. La figura 24 esquematiza la variación de la multiplicidad de infección del *P. falciparum* dependiendo de la edad durante los primeros 5 años de vida (hasta 48-59 meses de edad), calculando las medias en intervalos de un año.

Edad (meses)	Nº	Media de parásitos	Media de parásitos <i>msp-1</i>	Media de parásitos <i>msp-2</i>
6-11	106	2,7358	2,3113	2,0283
12-23	152	2,7763	2,4145	1,9868
24-35	56	3,0536	2,5714	2,1429
36-47	50	2,8600	2,2800	2,0800
48-59	45	2,9778	2,3111	2,1111
p		0,438	0,479	0,981

Tabla 29. Media estimada de parásitos y edad

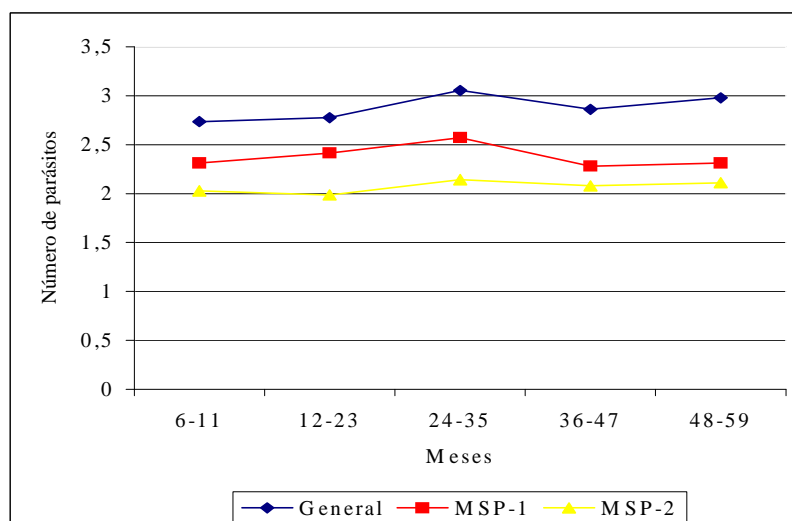


Figura 24. Media estimada de parásitos durante los 5 primeros años de vida.

En la figura 25 se observa la comparación de las medias de parásitos por muestra en los distintos grupos de edad, teniendo en cuenta la gravedad de la infección.

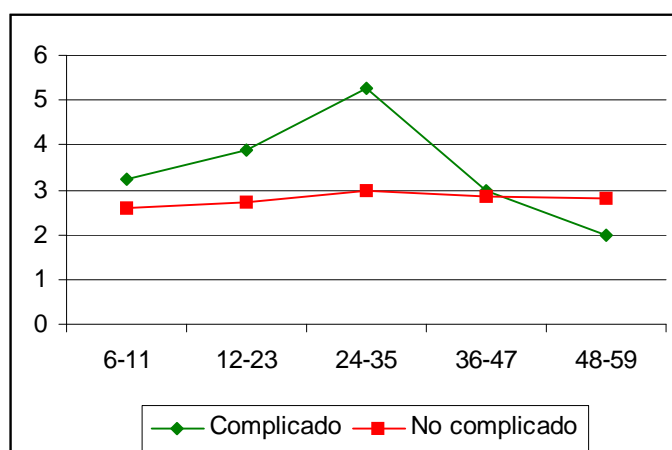


Figura 25. Relación entre la media de parásitos por muestra, edad (meses) y clínica.

La relación entre la media de parásitos y la densidad parasitaria se muestra en la tabla 30 y la figura 26. Al realizar un análisis de tendencia se observa un aumento significativo de la densidad con el aumento de la multiplicidad, tanto para el MOI general como para *msh-1* y *msh-2*. La disminución que se produce al final no varía la tendencia.

MOI				<i>msh-1</i>			<i>msh-2</i>		
Multiplicidad	Nº	Densidad	Media	Nº	Densidad	Media	Nº	Densidad	Media
0	-	-	-	1	4720	4720	24	306290	12762
1	40	500280	12507	81	1550610	19143	154	3318264	21547
2	140	2789398	19924	140	2712698	19376	125	2495978	19968
3	138	2853464	20677	148	3287684	22214	43	848250	19727
4	50	1548510	30970	28	893840	31923	31	984150	31747
5	26	793600	30523	9	267280	29698	19	553560	29135
>= 6	15	252820	16855	2	21240	10620	13	231580	17814

Tabla 30. Densidad parasitaria media del *P. falciparum* en relación con la multiplicidad de infección

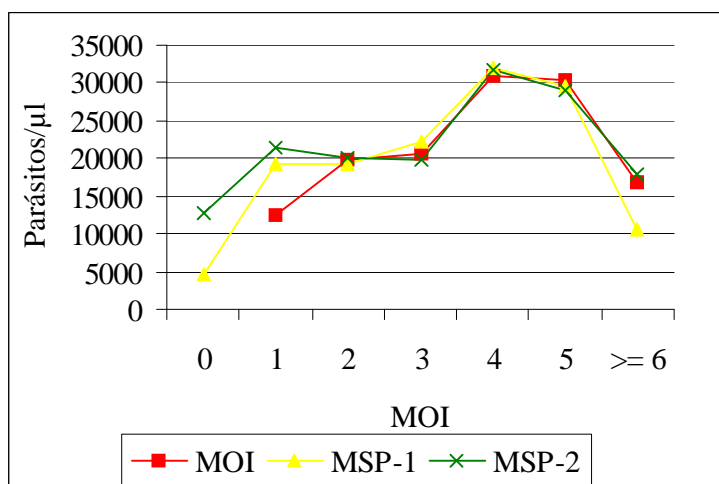


Figura 26. Densidad parasitaria media del *P. falciparum* con relación a la multiplicidad de infección.

3) Número máximo de parásitos encontrados en una muestra. Este número, definiéndolo como el número máximo de parásitos que tiene un único paciente, es de 8. Si tenemos en cuenta *msh-1* y *msh-2* por separado obtenemos un número máximo de 6 y 8 respectivamente. En la población de Malabo 1999 encontramos un número máximo de 6 para *msh-1* y 8 para *msh-2*, mientras que en Malabo 2001 fue de 5 y 4. Por otro lado en Bata 2001 fueron de 6 y 8. Un dato importante a resaltar es que en el grupo de Malabo 2001 no hay ningún paciente con más de 4 parásitos para *msh-2*, pero son relativamente frecuentes en Malabo 1999 (11%) y en Bata 2001 (9%).

En la población con paludismo complicado aparecen 4 parásitos como máximo para *msh-1* y 8 para *msh-2* y en los no complicados 6 y 7 respectivamente. En este caso el número de pacientes con más de cuatro parásitos para el *msh-2* es significativamente mayor en los casos complicados (22%) frente a los no complicados (4%).

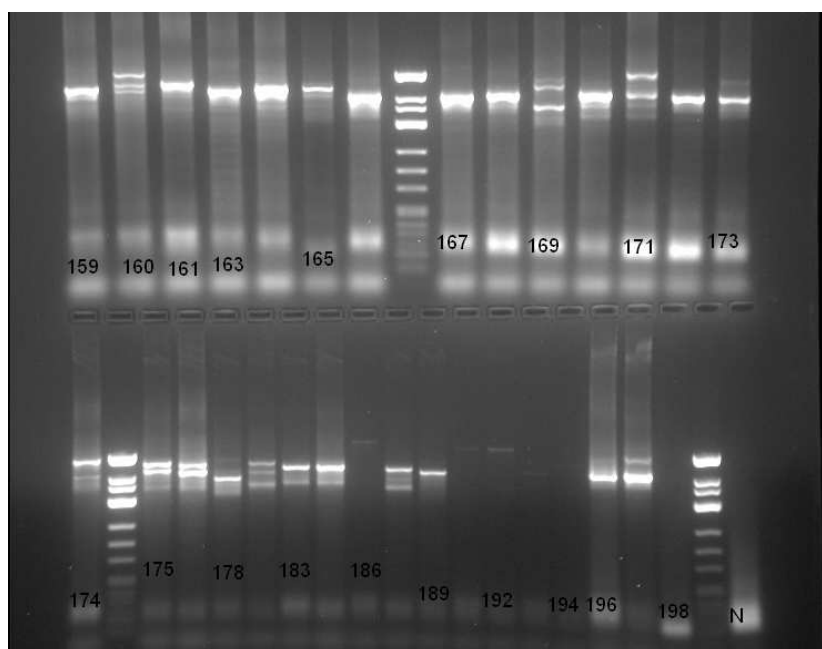


Figura 27. Resultado de la PCR con los cebadores MSP2. Se observa el número de alelos diferentes encontrados en cada muestra

En las poblaciones en las que se detectaron parásitos sensibles y resistentes a los antipalúdicos hubo un máximo de 6 parásitos para *msp-1* en ambos casos. Para *msp-2* se detectaron un máximo de 6 parásitos en el caso de los sensibles y 8 en el de los resistentes, no siendo esta diferencia significativa.

En la tabla 31 se muestra el número máximo de infecciones en los diferentes grupos de edad, teniendo en cuenta los dos genes estudiados. No se han hallado diferencias entre ellos.

Edad (meses)	Nº	<i>msp-1</i>	<i>msp-2</i>
6-11	106	5	8
12-23	152	6	7
24-35	56	5	8
36-47	50	5	6
48-59	45	5	7

Tabla 31. Número máximo de parásitos encontrados en los diferentes grupos de edad.

En la tabla 32 se hace un resumen de la multiplicidad de infección en todas las poblaciones, teniendo en cuenta el porcentaje de infecciones mixtas (MOI) encontradas en la población, el número medio de parásitos por muestra y el intervalo, es decir el número mínimo y máximo de parásitos encontrados, que aparece indicado entre paréntesis.

	N° de sujetos	General		<i>m</i> sp-1		<i>m</i> sp-2	
		% Infección múltiple	Media de parásitos /muestra	% Infección múltiple	Media de parásitos /muestra	% Infección múltiple	Media de parásitos /muestra
Total de individuos estudiados	409	90,2	2,83 (1-8)	80	2,38 (1-6)	56,5	2,04 (1-8)
Malabo 99	130	83,3	2,75 (1-8)	69	2,08 (1-6)	58,8	2,12 (1-8)
Malabo 01	91	91,2	2,55 (1-5)	82,4	2,38 (1-5)	58,5	1,68 (1-4)
Bata 01	188	94,1	3,04 (1-8)	86,7	2,59 (1-6)	59	2,16 (1-8)
Complicado	32	96,9	3,66 (1-8)	93,8	2,78 (1-4)	75,4	3 (1-8)
No complicado	247	92,7	2,78 (1-7)	83,2	2,49 (1-6)	55,5	1,88 (1-7)
Sensible	222	90,1	2,77 (1-6)	77,8	2,26 (1-6)	57,8	1,98 (1-8)
Resistente	128	89,8	2,88 (1-8)	84,4	2,52 (1-6)	61,2	2,09 (1-8)

Tabla 32. Resumen de la multiplicidad de infección en las diferentes poblaciones estudiadas.

4.2.3 VARIABILIDAD GENÉTICA

El estudio de variabilidad genética se realizó en las mismas muestras utilizadas para el estudio de multiplicidad y de eficacia terapéutica mencionadas en el apartado anterior (4.2.2).

Los alelos de los genes *m*sp-1 y *m*sp-2 se clasificaron teniendo en cuenta la secuencia (familias) y el tamaño de los fragmentos de amplificación por PCR. Las variaciones de longitud de las regiones estudiadas en cada gen son continuas. Para agrupar los alelos estas variaciones se han tomado en medidas de 25 pb.

Se utilizaron tres indicadores para este análisis: 1) número de poblaciones aparecidas de cada familia, 2) tamaño de los fragmentos de amplificación (alelos) y 3) frecuencia de aparición de los diferentes genotipos, entendiendo por genotipo la unión de una familia alélica del gen *m*sp-1 con alguna de las familias alélicas de *m*sp-2.

1) Número de poblaciones aparecidas de cada familia: El estudio de los genes *m*sp-1 y *m*sp-2 nos permitió detectar una alta variabilidad en ambos. Se encontraron 21 alelos para *m*sp-1 y 45 para *m*sp-2. Observando las tres familias en las que se encuentra dividido el gen *m*sp-1(K1, MAD20 y R033) (tabla 33), la que aparece con más frecuencia es K1 que además es la que mayor número de alelos diferentes tiene (11 alelos). En la familia R033 sólo se ha encontrado un tamaño alélico (150 pb) y por lo tanto se considera que tiene un solo alelo. En el gen *m*sp-2 (dividido en dos familias FC27 y 3D7) la familia que aparece con más frecuencia es la 3D7, sin embargo la que mayor número de alelos presenta es la FC27 con 27 alelos. Estas cifras nos indican que el *P. falciparum* de esta comunidad presenta un alto número de poblaciones diferentes.

	% aparición en la población	Nº alelos	Tamaño de los fragmentos (pb)
<i>msp-1</i>	99,8	21	125-850
K ₁	91	11	125-450
MAD20	58,2	9	150-500
R033	66,3	1	150
<i>msp-2</i>	94,2	45	200-850
FC27	43,2	27	200-850
3D7	90,2	18	350-850

Tabla 33. Descripción de los alelos detectados en los genes *msp-1* y *msp-2*.

En las tablas 34 y 35 detallamos la distribución de las familias y los alelos de los genes *msp-1* y *msp-2* en los diferentes grupos considerados. Las familias que aparecen con más frecuencia en la población total estudiada son también las más frecuentes en los diferentes grupos en los que se divide esa población.

	Nº muestras analizadas	MSP-1				MSP-2		
		% aparición / Nº alelos				% aparición / Nº alelos		
		Total	K1	MAD20	R033	Total	FC27	3D7
Malabo 99	130	99,2 / 19	89,2 / 11	43 / 7	54,6 / 1	91,5 / 35	34,6 / 20	90 / 15
Malabo 01	91	100 / 15	94,5 / 7	50,5 / 7	70,3 / 1	92,3 / 21	49,4 / 9	87,7 / 12
Bata 01	188	100 / 18	91,4 / 8	72 / 9	72,3 / 1	96,8 / 42	46,3 / 27	92,5 / 15

Tabla 34. Frecuencia de aparición de las familias de los genes *msp-1* y *msp-2* en los grupos de Bata (2001) y Malabo (1999 y 2001).

En la tabla 34 se observan algunas diferencias geográficas y/o temporales en cuanto a la distribución de las familias. En Bata es más frecuente la familia MAD20 que en Malabo, tanto en el año 1999 como en el 2001 ($p < 0,05$). La aparición de la familia R033 es mayor en el año 2001 tanto en Malabo como en Bata con respecto a Malabo 1999 ($p < 0,05$).

El número de alelos aparecidos en todas las familias (excepto en la familia R033) es menor en el grupo de Malabo 2001 que en Malabo 1999 y Bata. En la familia FC27 el número de alelos detectados es mucho más elevado en Malabo 1999 y Bata 2001 (20 y 27 respectivamente), que en Malabo 2001 (9 alelos). Además si vemos el rango de tamaños de los alelos para FC27 en Malabo 1999 y Bata 2001 éste va de 200 a 850 pb, sin embargo en Malabo 2001 va de 275 a 550 pb (datos no representados en las tablas).

En los casos complicados se observa en todas las familias donde se detecta más de un alelo, que tienen menos alelos diferentes que los casos no complicados (tabla 35). La mayor diferencia es para la familia K1 de *msp-1* (6 en complicados frente a 9 en no complicados) y la familia 3D7 de *msp-2* (11 en complicados frente a 16 en no complicados). Si comparamos el porcentaje de aparición de los alelos de la familia MAD20, éste es significativamente mayor en los complicados que en los no complicados (77,8% frente a 61%).

	N° muestras analizadas	<i>m</i> sp-1				<i>m</i> sp-2		
		% aparición / N° alelos				% aparición / N° alelos		
		Total	K1	MAD20	R033	Total	FC27	3D7
Complicado	32	100 /14	93,7 / 6	77,8 / 7	70,8 / 1	62,5 /32	40,6 /21	93,7 /11
No complicado	247	100 /18	92,4 / 9	61,6 / 8	71,9 / 1	99,6 /42	45,2 /26	90 /16
Sensible	222	99,5/19	91,4 / 9	56,3 / 9	62,6 / 1	92,8 /43	38,3 /27	88,7 /16
Resistente	128	100 /20	89,8 /11	60,1 / 8	71,1 / 1	94,5 /39	48,4 /26	89,8 /13

Tabla 35. Frecuencia de aparición de las familias y los alelos de los genes *m*sp-1 y *m*sp-2 en los grupos de paludismo complicado, no complicado y resistente o sensible a los antipalúdicos.

Si tenemos en cuenta las poblaciones sensibles y resistentes no parece haber diferencias entre ellas con respecto a la diversidad de sus genes. Si dividimos la población resistente en fracasos terapéuticos tardíos o precoces, el número de alelos encontrados para *m*sp-1 y para *m*sp-2 es mayor en los fracasos tardíos (14 frente a 19 en *m*sp-1 y 25 frente a 37 en *m*sp-2). Esta diferencia es mayor en los alelos de la familia FC27, 25 alelos en los fracasos tardíos frente a 14 en los precoces.

La relación entre la edad y la frecuencia de aparición de las diferentes familias alélicas tanto del gen *m*sp-1 como *m*sp-2 se muestra en las figuras 28 y 29. Se puede observar que no existe relación entre ambos parámetros siendo la distribución homogénea en todos los grupos de edad.

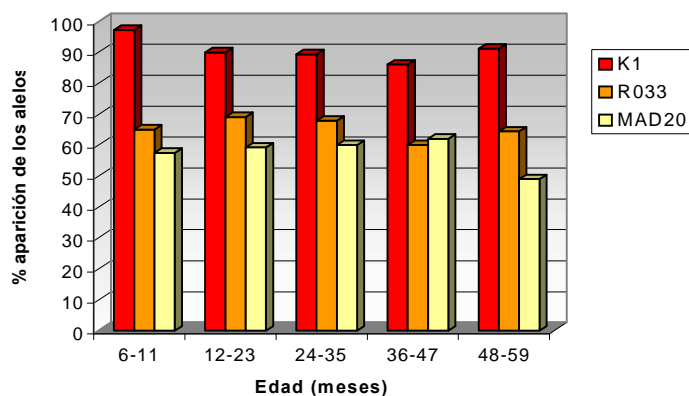


Figura 28. Relación entre la edad y la aparición de las familias del gen *m*sp1.

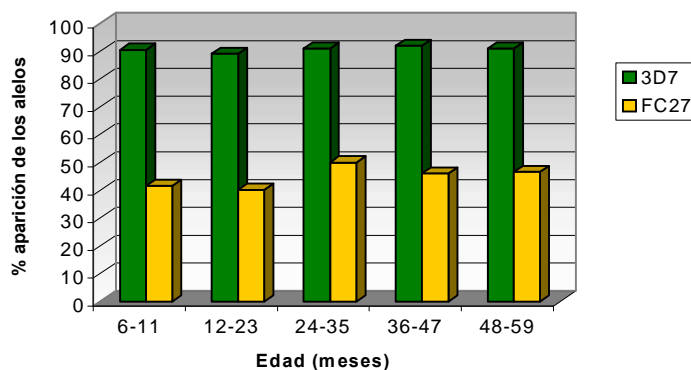


Figura 29. Relación entre la edad y la aparición de las familias del gen *m*sp-2

En la figura 30 se observa el número de alelos aparecido en cada grupo de edad, y se aprecia que en el gen *msp-2* hay una disminución de este número a medida que aumenta la edad, tanto para la familia 3D7 como la FC27.

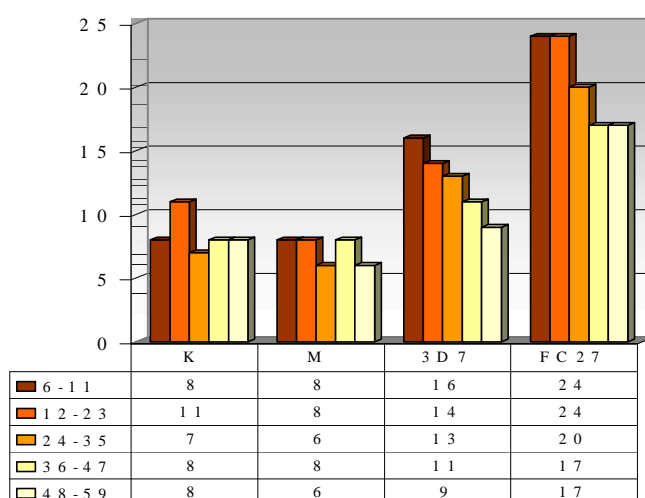


Figura 30. Número de alelos de los genes *msp-1* y *msp-2* en cada grupo de edad.

2) Tamaño de los fragmentos de amplificación: La frecuencia de aparición de los alelos de las diferentes familias de cada gen se calcularon dividiendo el número de muestras de un tamaño concreto por el total de muestras positivas para esa familia (Figuras 31 y 32).

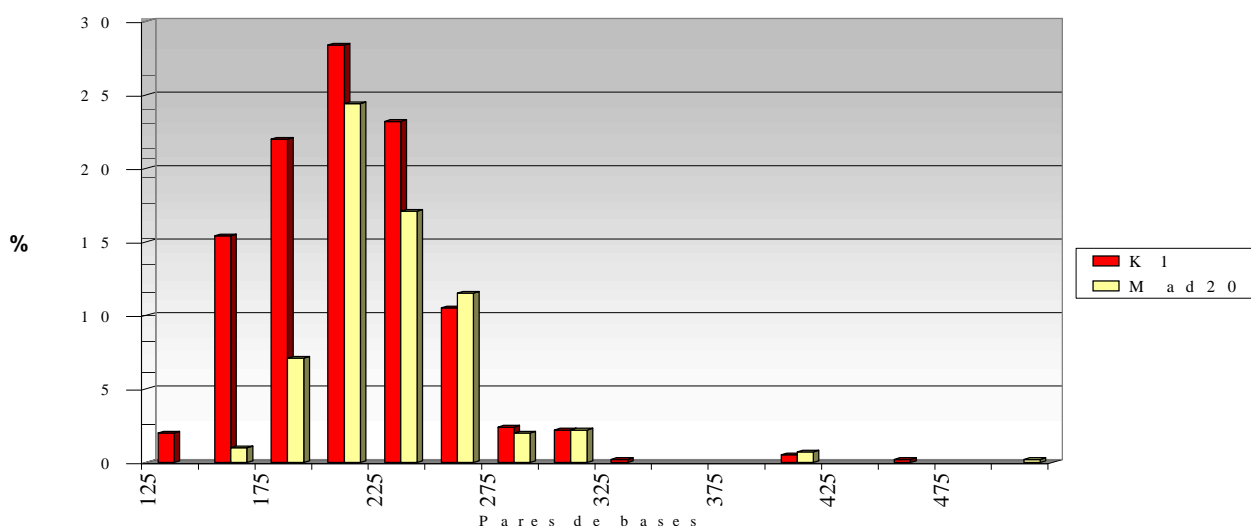


Figura 31. Tamaños alélicos detectados en las familias del gen *msp-1*.

En la familia K1 encontramos un rango entre 125 y 450pb, apareciendo con más frecuencia el tamaño 200pb (28%). En la familia MAD20 el rango va de 150 a 500 pb y el más frecuente también es el de 200pb (24%). En la familia R033 sólo se ha detectado el tamaño de 150 pb. En cuanto a las familias del gen *msp-2* (FC27 y 3D7), el rango en ambas es mayor que los anteriores, de 200 a 850 pb para FC27 y 350 a 850 pb para 3D7. El tamaño más frecuente en la FC27 fue de 400pb, aunque al haber tanta diversidad (27 tamaños

diferentes) su aparición fue sólo del 8,3%. En la familia 3D7 el alelo más frecuente fue el de 450pb con 23,2%.

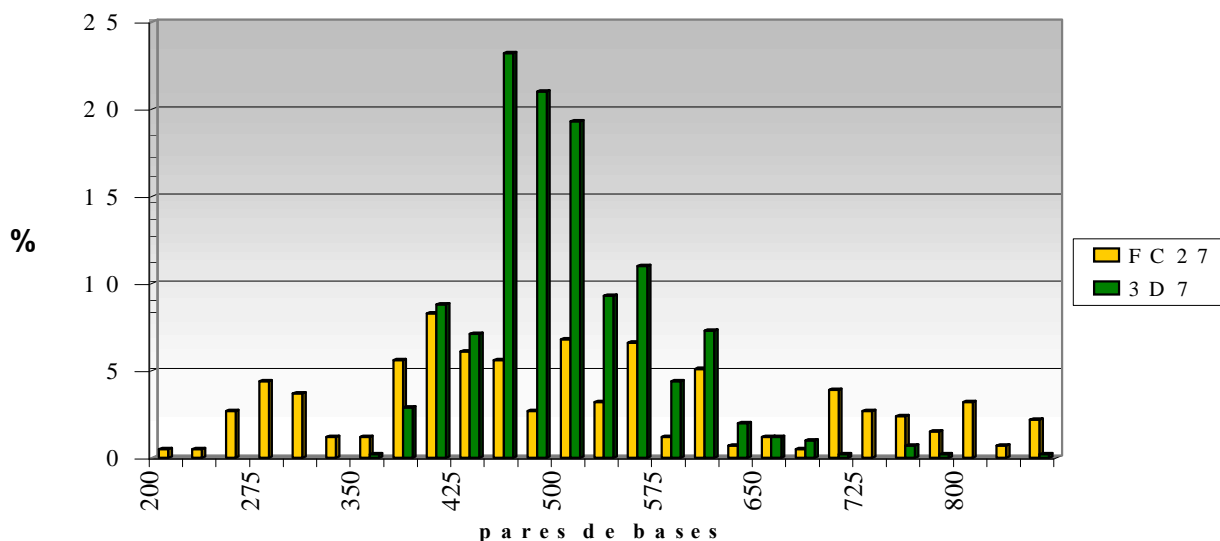


Figura 32. Tamaños alélicos detectados en las familias del gen *msp-2*.

Comparando los tamaños de los alelos aparecidos en los diferentes grupos de población estudiados encontramos que algunos alelos sólo aparecen en Bata, como son los alelos de 200, 675, 700, 725, 750 y 775 pb de la familia FC27, el alelo de 775pb de la familia 3D7, ambas del gen *msp-2*, y el alelo de 500pb de MAD20, familia del gen *msp-1*.

En cuanto a las poblaciones de paludismo complicado y no complicado, el primero tiene un menor número de alelos diferentes. Sin embargo son significativamente más frecuentes en la familia FC27 los alelos de 600 y 800 pb (15,6% frente a 4,4% y 12,5% frente a 1,6%, respectivamente) en las complicadas.

Las poblaciones resistentes a los antipalúdicos y las sensibles sólo difieren de manera significativa en la aparición del alelo de la familia K1 de 225pb que es mayor en la resistente (32,8% frente a 17,6%, $p=0,001$).

3) Frecuencia de aparición de los genotipos: Los genotipos se han definido como la unión de una familia del gen *msp-1* y otra del gen *msp-2*. Se han detectado 6 genotipos diferentes, cuya frecuencia se muestra en la tabla 36. Al ser las familias 3D7 y K1 las más frecuentes en sus genes también su unión es la más frecuentemente encontrada.

Genotipo	Frecuencia	%
FC27-R033	124	30
FC27- MAD20	108	26,4
FC27- K1	161	39,3
3D7- R033	251	61,3
3D7- MAD20	217	53
3D7- K1	342	83

Tabla 36. Genotipos encontrados en la población.

La frecuencia de aparición de los genotipos en los diferentes grupos de población estudiados se ve reflejada en la tabla 37.

	FC27 R033	FC27 MAD20	FC27 K1	3D7 R033	3D7 MAD20	3D7 K1
Población total	124 (30%)	108 (26,4%)	161 (39,3%)	251 (61,3%)	217 (53%)	342 (83%)
Malabo 99	27 (20,7%)	17 (13%)	39 (30%)	64 (49,2%)	50 (38,4%)	104 (80%)
Malabo 01	33 (36,2%)	27 (29,6%)	43 (39,1%)	58 (63,7%)	41 (45%)	75 (83,3%)
Bata 01	64 (34%)	64 (34%)	79 (42%)	129 (68,6%)	126 (67%)	163 (86,7%)
Complicado	13 (40,6%)	17 (53%)	18 (56%)	22 (68,7%)	26 (81%)	28 (87,5%)
No complicado	84 (34%)	74 (30%)	104 (42%)	165 (66,8%)	141 (57%)	213 (86%)
Sensible	53 (23,8%)	45 (20,2%)	76 (34%)	127 (57,2%)	111 (50%)	180 (81%)
Resistente	48 (37,5%)	42 (32,8%)	57 (44,5%)	84 (65,6%)	71 (55,4%)	107 (83,6%)

Tabla 37. Genotipos encontrados en los diferentes grupos de población.

En la población resistente al tratamiento antipalúdico aparece con más frecuencia ($p=0,04$) los genotipos FC27-R033 y FC27-MAD20. Si separamos según los medicamentos, la mayor frecuencia de FC27-R033 se mantiene en parásitos resistentes a los tres, sin embargo para FC27-MAD20 esta diferencia desaparece en el caso de resistencias al S/P y se mantiene con la cloroquina y la quinina.

La mayor diferencia aparece entre los grupos de Malabo 1999 y Bata 2001. En este último se encuentran con una frecuencia significativamente mayor los genotipos FC27-MAD20 y 3D7- MAD20.

Si tenemos en cuenta la influencia de todas las variables sobre la relación entre dos de ellas (regresión logística), observamos que la diferencia entre los grupos resistente y sensible desaparece. Sin embargo entre los grupos de Malabo y Bata se mantiene, lo que nos estaría indicando la existencia de diferencia geográfica entre las poblaciones parasitarias.

Con relación a la edad, no se han encontrado diferencias en la frecuencia de aparición de los genotipos entre los diferentes grupos.

4. DISCUSIÓN

La estrategia global del control del paludismo tiene como componente fundamental el diagnóstico rápido así como el tratamiento precoz y efectivo de los casos. Este último punto se hace difícil, ya que en muchos países del África subsahariana se ha producido un importante incremento de los niveles de resistencia a los antipalúdicos usados con más frecuencia, como la cloroquina o la sulfadoxina/pirimetamina. Dichos niveles de resistencia son cada vez mayores y se está produciendo una rápida expansión. A pesar de todo, en algunos países como Guinea Ecuatorial, estos medicamentos se siguen utilizando como tratamiento de primera y segunda elección para el paludismo no complicado, tanto por su bajo coste como por su amplia accesibilidad (Mockenhaupt y col., 2005).

Teniendo en cuenta el nivel de resistencia que existe a los distintos tratamientos antipalúdicos, se hace necesario un seguimiento continuo de estas, mediante la realización de estudios de eficacia terapéutica de los antipalúdicos empleados en un determinado país, para determinar si la política de tratamiento es la más efectiva o sería necesario cambiarla. En nuestro estudio se ha analizado la eficacia de tres pautas de tratamiento en Guinea Ecuatorial: cloroquina y la combinación sulfadoxina/pirimetamina (1ª y 2ª líneas de tratamiento respectivamente para el paludismo no complicado en el momento de la realización del estudio, aunque actualmente la sulfadoxina/pirimetamina (SP) es de primera elección en Bioko, región insular del país) y quinina (de elección para el tratamiento de casos resistentes a los anteriores o de 1ª línea para el tratamiento del paludismo complicado). En los tres estudios que hemos llevado a cabo se ha podido comprobar que *Plasmodium falciparum* es altamente resistente a los antipalúdicos probados a lo largo de todo el país, sin embargo tanto la prevalencia como la intensidad o la evolución de la resistencia no es uniforme para los diferentes medicamentos analizados.

Durante el año 1999 en Malabo la resistencia detectada *in vivo* a la cloroquina superó los límites estimados como aceptables (58% de fracasos terapéuticos) al igual que lo detectado en Bata en 2001 (59%). A estas cifras se llega como resultado de la evolución de las tasas de resistencia a cloroquina estudiadas desde 1992, donde fueron del 41% en Malabo y del 15% en Bata (Roche y col., 2003). Cuando ajustamos los fracasos terapéuticos con el estudio molecular para diferenciar recaídas de reinfecciones, éstos bajan del 58% al 45%. Aún así superan la tasa de fallo terapéutico del 25% tras 14 días de tratamiento, que es la tasa que proponía la OMS como límite admisible para abandonar un determinado tratamiento y cambiar la política terapéutica de un área determinada (WHO, 2001). En las últimas recomendaciones del año 2006 (WHO, 2006) se amplían nuevamente los estudios hasta 28 días porque aparecían recaídas después del día 14, sobreestimando la eficacia del medicamento. En nuestros análisis la ampliación de los estudios sólo reafirmaría los malos resultados de eficacia obtenidos. De todas maneras el hecho de ampliar los estudios hasta el día 28 hace necesario el diferenciar entre recaídas y reinfecciones porque, como veremos más tarde, al ser una zona de alta transmisión y endemicidad se podrían interpretar como fallos terapéuticos lo que realmente son reinfecciones. En estos casos se sobreestimaría la resistencia a los medicamentos.

En una reciente revisión de estudios de eficacia terapéutica realizados en Camerún (Basco y col., 2006), país limítrofe con la región continental de Guinea, los niveles de resistencia encontrados a la cloroquina son también muy elevados. Se realizaron en niños menores de 10 años, según protocolo de la OMS con seguimiento de 14 días, entre los años 1999 y 2004. La tasa de fracasos de la cloroquina llegó al 48,6%, similar a la que detectamos en un nuestro estudio en Guinea Ecuatorial. En este estudio concluyen que la cloroquina no puede ser un medicamento viable y por tanto es eliminado como medicamento oficial en el tratamiento del paludismo no complicado. En otros países de África subsahariana también se han encontrado cifras de escasa eficacia, como por ejemplo en Chad (32,9% de fallos terapéuticos) (Grandesso y col., 2006), Ghana (58%) (Mockenhaupt y col., 2005), República Centroafricana (40,9%) (Menard y col., 2005) y Angola (85,5%) (Guthmann y col., 2005). En todos ellos se aconseja el cambio de política terapéutica.

En el caso de la cloroquina no sólo se debe considerar las altas tasas de fracasos terapéuticos, sino las consecuencias clínicas que conllevan dichos fracasos, sobre todo cuando se trata de fracasos precoces. En un estudio publicado en el año 1998 por Ekvall y colaboradores, las tasas de fracasos terapéuticos precoces se asociaron a recuperaciones de anemia mucho más lentas, lo que favorecía la evolución a paludismos complicados de algunos que en un principio no lo eran. En los dos estudios presentados las tasas de fracasos terapéuticos precoces son elevadas (en 1999 un 32% y en 2001 un 33%), por tanto no sólo la curación es menor sino que la recuperación del enfermo puede demorarse. Por todo esto y en consonancia con el resto de los países de la zona, se debe considerar muy seriamente un cambio en las recomendaciones nacionales en cuanto a la primera línea de tratamiento del paludismo no complicado.

Creemos muy importante destacar que cuando la cloroquina se demuestra capaz de actuar frente al parásito aclara la parasitemia con más rapidez, y por tanto sigue siendo uno de los fármacos más eficaces frente al plasmodio (Gilles y col., 1993). Parece además que la resistencia al antipalúdico disminuye cuando se elimina la presión del medicamento (Laufer y col., 2004), pudiendo volverse a usar tras un tiempo. En Malawi, donde el cambio de medicamento se realizó hace 12 años, se ha vuelto al tratamiento con cloroquina. En un estudio realizado en noviembre de 2006 por Laufer y colaboradores se ha visto que el tratamiento con cloroquina tenía una eficacia del 99%, una media de aclaración de la parasitemia de 2,6 días y de la clínica de 10,3 horas y sin efectos secundarios destacables. En una revisión de Ginsburg (2005) se afirma que la cloroquina se debería tener en cuenta para el tratamiento por su eficacia, bajo coste y escasez de efectos secundarios. Recomienda su uso en adultos semiinmunes e incluso en pacientes con parásitos resistentes a la cloroquina. Basa estas afirmaciones en que su actividad es pleiotrópica haciendo que la resistencia se puede deber a diferentes mecanismos. Uno de ellos, donde intervine el glutatión, puede ser reversible con medicamentos que disminuyen el glutatión celular. Ese es el caso del disulfiram o el paracetamol. El autor se pregunta si, al utilizar en la actualidad la terapia de combinación contra el paludismo no se deberían de considerar estas combinaciones.

En Guinea Ecuatorial, durante la realización de estos estudios, la segunda línea de tratamiento era la sulfadoxina/pirimetamina. En el estudio realizado durante el año 1999 la tasa de fracasos terapéuticos a esta

combinación fue de un 24% lo que lo situaba sólo 1% por debajo del límite juzgado como aceptable. Esta tasa disminuye al 20% al ajustarlo con el estudio de los genes *msh-1* y *msh-2* (el estudio de estos genes nos permite discriminar una reinfección de una resistencia real) aunque esta variación no es significativa. Probablemente se deba a su larga vida media, que previene la aparición de nuevas infecciones y el parásito que reaparece es auténticamente resistente.

En el año 2001 estos fracasos aumentaron al 35%, sobrepasando entonces el límite admitido. La vigilancia a lo largo de los años (desde el año 1992) nos muestra una tendencia al aumento de las resistencias, tanto en los fracasos tardíos como en los precoces (Roche y col., 2003). Sin embargo aunque sus fracasos precoces no son altos, al contrario de lo que ocurre con la cloroquina, la tendencia de sus niveles de resistencia indica que su utilización como único tratamiento los aumentaría. Este aumento de resistencia viene a apoyar el cambio de política propuesto por la OMS en el 2001 (WHO, 2001) de monoterapia al politratamiento. Como en otras enfermedades como el SIDA o la tuberculosis, se vio la necesidad de combinar medicamentos para poder eliminar completamente los microorganismos causantes de la enfermedad y evitar la aparición de cepas resistentes. En el caso del paludismo el tratamiento siempre produce una eliminación incompleta de parásitos, dejando poblaciones basales de parásitos resistentes (no pudiéndose detectar por microscopía) que serán eliminados mediante la acción del sistema inmunitario del paciente. Cuando el medicamento no es eficaz, bien por su conservación, bien porque está mal fabricado o porque el parásito es resistente, provoca que su efecto sea menor que el esperado, con lo cual esas poblaciones basales sean cada vez mayores, y el sistema inmune del paciente no es suficiente para eliminarlas completamente. Esto provoca que las poblaciones resistentes (que no se podrían eliminar) aumenten cada vez más, y se expanda cada vez más en un área determinada. El uso de una combinación de medicamentos con distintas vidas medias y efecto sinérgico, permite la eliminación casi total de los parásitos, cuando baja la acción del fármaco de menor vida media el de acción más prolongada está en su nivel de mayor efectividad. Además si se utiliza una combinación es más probable que sea sensible a al menos uno de los medicamentos utilizados, evitando así la selección de cepas resistentes. En el caso de sulfadoxina/pirimetamina se ha producido un aumento de su uso como único medicamento por la escasa eficacia de la cloroquina, aunque las directrices oficiales no lo recomendaran así. Esto ha favorecido el aumento de su tasa de fracasos en el año 2001.

En el estudio realizado en Camerún (Basco y col, 2006), los niveles de fallos terapéuticos de la sulfadoxina/pirimetamina (9,9%) son menores que en Guinea Ecuatorial. Probablemente los estudios realizados a lo largo de los años por el Ministerio de Sanidad junto al Instituto Pasteur han facilitado el conocer su eficacia y la evolución de su resistencia. A partir de aquí la política de utilización de los antipalúdicos en Camerún ha facilitado el control en el uso de este medicamento, siendo su recomendación la de no utilizarlo en monoterapia. Hace ya tiempo que en Camerún no se utiliza como medicamento único y por tanto sus tasas de resistencia son menores.

Las tasas de resistencia a la sulfadoxina/pirimetamina en diferentes países de África subsahariana son más variables que para la cloroquina. Así podemos encontrarnos tasas de 12% en Burkina Faso

(Coulibaly y col., 2006) o del 16% en Chad (Grandesso y col., 2006) y del 23 % en la República Centroafricana (Menard y col., 2005), el 25% en Angola (Guthmann y col., 2005) o el 40 % en Ghana (Koram y col., 2005). Posiblemente estas variaciones se deban a la mayor o menor utilización que se haya hecho de la sulfadoxina/pirimetamina como primera opción de tratamiento tras el fracaso de la cloroquina. Esto se ve claramente en el caso de Malawi, que cambió su primera línea de tratamiento a la sulfadoxina/pirimetamina hace 12 años y en el último estudio de eficacia (Laufer y col., 2006) revela una tasa de fracasos del 21%.

Después del 2001 en Guinea Ecuatorial se ha estado utilizado este medicamento fundamentalmente para el tratamiento del paludismo complicado asociado a la quinina. De esta manera se acorta el tiempo de tratamiento y una vez que se le da de alta al paciente, se le administra una dosis de sulfadoxina/pirimetamina terminando la pauta en el hospital. En el estudio del año 2002 ya pudimos comprobar una disminución de la tasa de fracasos de la sulfadoxina/pirimetamina, reduciéndose del 35% (en 2001) a tan sólo el 17%, siendo un 6,3% fracasos precoces. Por tanto, si planteamos un cambio en la política de tratamiento del paludismo no complicado, se debe valorar su uso siempre en asociación con otros antipalúdicos que tengan vidas medias distintas para evitar la aparición de resistencias, o que se produzcan un aumento de las mismas, siguiendo las recomendaciones dadas por la OMS (WHO, 2006). Son posibles fármacos a asociar clorproguanil, dapsona (Mutabingwa y col., 2001) o artesunato. Estas combinaciones ya se han encontrado eficaces en varios países africanos, llegando en algunos casos como en Ghana (Koram y col., 2005) o República Centroafricana (Menard y col., 2005) al 100% de eficacia. Existen autores (Plowe y col., 2004) que recomiendan el uso de S/P como único medicamento si las tasas de resistencia de la cloroquina son muy altas, hasta que se produzca el cambio a tratamiento combinado, ya que su introducción es más sencilla. La OMS (WHO, 2006) recomienda utilizar amodiaquina + sulfadoxina/pirimetamina hasta la introducción de tratamiento combinado con un derivado de artemisina. Esta opción es más aceptable ya que hemos visto como aumenta rápidamente la resistencia del S/P al utilizarlo sólo.

En Guinea Ecuatorial la combinación artesunato +sulfadoxina/pirimetamina se probó durante el año 2002 comparando su eficacia con la S/P en monoterapia. Los resultados obtenidos indican claramente que este tratamiento combinado es más eficaz (99% frente al 80%). En todos los parámetros estudiados, como evolución de la parasitemia, prevalencia de gametos en sangre o recuperación hematológica fueron mejores los resultados encontrados con el uso de la combinación que con la sulfadoxina/pirimetamina como único medicamento. La asociación, por tanto, no presenta sólo beneficios clínicos sino también epidemiológicos ya que al permanecer los gametocitos menos tiempo en sangre estaríamos disminuyendo la transmisión del paludismo y reduciendo la incidencia de la enfermedad en la zona. En el año 2005 se han probado las combinaciones amodiaquina/SP y artesunato/SP en Guinea Ecuatorial, obteniéndose un nivel de efectividad cercana al 100% con ambas combinaciones (96,5% y 99% respectivamente) (datos no publicados).

Desde el año 2001 la OMS recomienda la utilización de tratamiento combinado con derivados de la artemisina (ACT). Hoy en día los ACTs son considerados la mejor opción para el tratamiento del paludismo no complicado. La OMS basa en la evidencia estas afirmaciones tras el análisis de múltiples estudios

randomizados. Han demostrado una gran eficacia siendo las combinaciones recomendadas: amodiaquina-lumefantrina, artesunato-mefloquina, artesunato-amodiaquina y artesunato-sulfadoxina/pirimetamina. Estas dos últimas recomendaciones son útiles siempre y cuando la resistencia a amodiaquina o sulfadoxina/pirimetamina utilizados en monoterapia no supere el 20%, como es el caso en Guinea Ecuatorial.

Para cambiar la política de tratamiento y por tanto el antipalúdico de primera intención es necesario tener en cuenta aspectos tanto epidemiológicos del país como su situación económica (si sus habitantes podrían obtener dicho tratamiento o si el gobierno podría subvencionarlos, ya sea por sí mismos o con ayuda externa) y del medicamento (eficacia, aceptabilidad, fácil administración). En el caso de Guinea Ecuatorial tanto su epidemiología como su situación económica actual son favorables al cambio. La combinación artesunato + S/P podría ser una buena opción ya que hemos visto que es altamente eficaz, al igual que la combinación artesunato-amodiaquina. En la actualidad se ha probado en Guinea Ecuatorial la combinación amodiaquina/artesunato (estudio de 28 días), con buen resultado clínico, en espera de los estudios moleculares.

La aceptación por parte de la población está garantizada ya que durante el estudio se percibió un gran entusiasmo de la misma debido a la rápida eficacia del medicamento. El principal obstáculo que creemos impide su instauración es el coste económico del medicamento. Esta combinación tiene un coste de 1,5\$, en comparación con los medicamentos usados actualmente, cloroquina (0,15\$) y S/P (0,25\$). Sin embargo se están haciendo esfuerzos por parte de las organizaciones internacionales para aumentar el subsidio de los antipalúdicos. Conseguir las combinaciones en un solo comprimido (coformulación) abarataría mucho el precio y es la línea elegida por grandes multinacionales para bajar dramáticamente el coste.

En Guinea Ecuatorial el artesunato se ha introducido en el mercado negro y, debido a que es bien conocida su eficacia, se ha extendido rápidamente su utilización por todo el país sin ningún control sanitario. Esta falta de control podría provocar la aparición de resistencias al medicamento debido a su mal uso o a su menor efectividad (por falta de control de calidad del fármaco, condiciones de control o almacenaje...). Serían necesarios por tanto, fondos para asegurar la correcta utilización de este medicamento en combinación: monitorizar su correcto uso, asegurar la adherencia por parte de los pacientes a los tres días de tratamiento, proporcionar una educación sanitaria para la introducción de la combinación, así como proveer de medicamentos que desde el mismo momento del proceso de fabricación están controlados, para garantizar su funcionamiento y efectividad. Algunos autores (WHO, 2004) plantean la problemática de la vigilancia de la eficacia del tratamiento sobre todo ante un probable uso masivo en los países subsaharianos. Proponen la creación de redes de vigilancia como la Red de Monitorización de Tratamiento Antipalúdico de África del Este que actúa como una red centinela y provee de información actualizada a los Ministerios de Sanidad de la zona, o la Red de Vigilancia de los países de habla portuguesa. En esta última se incluyen todos los países africanos lusoparlantes así como Brasil, y también por la proximidad con estos países se ha incluido a Guinea Ecuatorial, junto con el ISCIII, para participar en esta red de vigilancia. Sería deseable que en aquellas zonas donde se instaurara este tratamiento combinado hubiera una supervisión constante para el control y vigilancia de la aparición de resistencias.

Esta dificultad de coste y vigilancia no debe retrasar la acción de cambio ya que continúan aumentando las tasas de morbi-mortalidad y empeorando las tasas de resistencia. Mubyaci y col. (2005) reconocen la dificultad de dicho cambio, sobre todo a nivel político, y que el proceso que llevaría a este cambio necesita un tiempo. Ponen mucho énfasis en la comunicación entre los técnicos y los políticos y en la implicación de todos los actores: políticos, industria farmacéutica, sanitarios, medios de comunicación y población general. Aunque sea una acción compleja, creemos que los esfuerzos de las diferentes organizaciones que actualmente trabajan en Guinea Ecuatorial en este tema, al igual que a nivel político, deben ir dirigidos a conseguir un correcto tratamiento del paludismo y una adecuada información a la población general para conseguir su implicación. Como además la red para el control ya está creada se hace más fácil esta instauración.

En cuanto al tratamiento del paludismo complicado, los resultados obtenidos tanto en Bata como en Malabo con respecto a la sensibilidad del parásito frente a la quinina hay que interpretarlos con mucha precaución. En un principio serían alarmantes ya que los niveles están por encima del 25%. Sin embargo cuando diferenciamos recaídas de nuevas infecciones (estudio que analizaremos más adelante), estos niveles de resistencia a la quinina varían significativamente pasan de un 32% a un 8%, posiblemente porque su vida media es más corta y es más probable que la reaparición del parásito se deba a una nueva infección por una nueva picadura del mosquito que a una auténtica resistencia. Guinea es una zona hiper-holoendémica de paludismo con una alta prevalencia y con una transmisión casi constante a lo largo del año, lo que hace probable que aparezcan reinfecciones. Por tanto el 8% de resistencia detectada está más de acuerdo con la realidad de la sensibilidad frente a la quinina en el tratamiento del paludismo complicado. En otros países de la zona como Camerún (Achidi y col., 2005) los fracasos llegan al 5,8%. Todavía quedan otros factores, como la adherencia al tratamiento (es un tratamiento largo y con muchos efectos secundarios, además fue el único de los tratamientos incluidos en el estudio que no se administró bajo observación) que pueden aumentar erróneamente el fracaso terapéutico y que en realidad el nivel de resistencia sea aún más bajo. Esta última afirmación se ve respaldada por la observación de que la mayor parte de los fracasos son tardíos, mientras que los fracasos precoces no suponen más del 1%.

Lo comentado anteriormente nos permite afirmar que la quinina mantiene su eficacia frente a *P. falciparum* en Guinea Ecuatorial. El empleo de la quinina como primera línea de tratamiento en cualquier caso de paludismo se ha desechado por su dosificación compleja (3 veces al día durante 7 días), su sabor amargo y sus efectos secundarios desagradables, utilizándola sólo en los casos de paludismo grave. Aunque en Guinea Ecuatorial las tasas globales de fallos terapéuticos a este antipalúdico están estables desde 1994, hay estudios que apuntan que en algunos países africanos (Esamai y col., 2005; Adam y col., 2004) se ha producido un avance de la resistencia a este medicamento. Por lo tanto es preferible mantener su uso sólo en casos de paludismo grave o multirresistencia para evitar precisamente el desarrollo rápido de su resistencia.

Se han postulado tratamientos combinados para paliar la falta de seguimiento del tratamiento y la incipiente aparición de resistencias en algunos países. Así la combinación de quinina intravenosa con otro medicamento vía oral cuando el paciente admita esta vía, parece que podría evitar ambos inconvenientes.

Algunas combinaciones utilizadas han sido quinina+Malarone® (Esamai y col., 2005) o quinina+S/P (Athán y col., 2001). Esta última combinación por su precio, es mucho más asequible para los países de África Subsahariana y es la utilizada en Guinea Ecuatorial. Aunque su utilización no esté recomendada de forma oficial y no existen estudios de eficacia, parece que el seguimiento es mayor ya que se hace en su totalidad en el hospital (dosis única del S/P al alta del paciente, frecuentemente a los 3-4 días de tratamiento IV), es decir bajo supervisión.

En las últimas recomendaciones de la OMS se compara la administración oral de la quinina con la rectal, pero no hay suficientes evidencias para recomendar esta última. También se analizan otras opciones terapéuticas para el tratamiento del paludismo complicado como los derivados de la artemisina. Se sugiere el tratamiento con artesunato IV de elección en adultos con paludismo severo. Sin embargo no hay evidencias para tratar a los niños, sobre todo en áreas de alta transmisión. Así el artesunato IV se recomienda como primera elección en áreas de baja transmisión de paludismo.

Otras alternativas aceptadas a la quinina IV para el tratamiento del paludismo complicado son el artemeter IM o el artesunato rectal. Este último tiene mayor efecto que la quinina IV reduciendo las densidades parasitarias a las 12 y 24 horas después de la administración. A pesar de esta eficacia, la OMS aconseja el tratamiento con artemisininas rectales sólo cuando la vía parenteral no es posible.

Se ha demostrado la utilidad del estudio mediante PCR de los genes *msp-1* y *msp-2* de *P. falciparum* para poder diferenciar cuando es una recaída o cuando una reinfección, algo necesario para poder evaluar de forma eficaz la actuación de los distintos tratamientos en el área de estudio. Sin embargo los resultados deben interpretarse con alguna precaución debido a: a) los altos niveles de multiplicidad poblacional del parásito que se detectan en esta área, y b) la elevada presencia de infecciones mixtas en una muestra (69% antes del tratamiento y 55% después), es decir de diferentes cepas de *Plasmodium falciparum* con diferentes grados de resistencia. Estos dos factores contribuyen a hacer más difícil la comparación de las muestras inicial y final.

Algunos autores (Magesa y col., 2001; Randford-Cartwright y col., 1997) mencionan tres circunstancias que podrían explicar la presencia de nuevos alelos en las muestras R (después del tratamiento) además de los mismos alelos aparecidos en las muestras O (antes del tratamiento) tras el estudio de los genes *msp-1* y *msp-2*: 1) parásitos que se encontraban en el estadio pre-eritrocitario cuando se tomaron las muestras iniciales y por tanto no estaban en la sangre periférica; 2) parásitos secuestrados y que no estaban presentes en la circulación en el momento de tomar la muestra y 3) una baja proporción de parásitos de manera que no hubieran sido amplificados por la PCR. En países con paludismo holoendémico la probabilidad de estas situaciones en comparación con la probabilidad de nuevas infecciones es muy baja. En este estudio 5 pacientes tuvieron en la muestra R los mismos alelos que en la muestra O con unos nuevos adicionales, y se han considerado como muestras mixtas, es decir con nuevas infecciones y recrudescencia.

Una conclusión que podemos sacar de este estudio es que 10 casos (34%) que presentaron los mismos parásitos en las muestras R y O fueron resistentes al tratamiento. Un 18% de los niños con ambos, nuevas infecciones y recrudescencia, se incluyeron como muestras resistentes. Aproximadamente un 48% de

los parásitos que aparecieron después del tratamiento se deben a nuevas infecciones así que podemos concluir que en esos niños los parásitos encontrados en sus muestras iniciales fueron sensibles al medicamento utilizado. Por tanto los niveles de resistencia, como ya hemos visto anteriormente, son menores a los encontrados en los estudios *in vivo* en todos los medicamentos analizados: 45% para la cloroquina, 20% para la sulfadoxina/pirimetamina y un 8% para la quinina, aunque en el caso de la S/P la diferencia no es significativa. Esto probablemente se deba a su larga vida media que previene las nuevas infecciones y así el parásito que reaparece es realmente resistente. Por otro lado, los niveles de resistencia a la quinina han variado significativamente ($p < 0,01$), porque su vida media es más corta y es más probable que la reaparición de nuevos parásitos se deba a picaduras infectivas de anófeles al principio de la observación. Los niveles de resistencia de la cloroquina también varían significativamente ($p < 0,05$), pero aún así la resistencia sigue siendo muy elevada.

Con esta distinción entre recaídas y reinfecciones nos cuestionamos cual sería la duración idónea de los estudios *in vivo*. Basco y col. (2000) compararon 52 pares de muestras en Camerún, y encontraron que un 42% eran reinfecciones, de las que un 95% aparecieron después del día 14 (sólo hubo una antes del día 14). Las recaídas fueron más frecuentes en el grupo tratado con cloroquina y sobre todo antes o durante el día 14. En estudios realizados en Tanzania (Magesa y col., 2001) y en Gabón (Randford-Cartwright y col., 1997) también se encuentra que las recaídas tardías contienen con mayor frecuencia parásitos nuevos que las tempranas. Estos autores proponen una duración de los estudios de sensibilidad *in vivo* de 14 días en zonas endémicas, para prevenir la aparición de nuevas infecciones que interfieren en los resultados. Si tenemos en cuenta nuestros resultados, con una duración de 14 días se perderían la mayoría de las recrudescencias y estaríamos sobrevalorando la eficacia de los antipalúdicos. Como las nuevas infecciones también aparecen a partir del día 14 recomendamos, al menos en áreas de alta endemicidad, que la duración de los estudios sea de 28 días, como así hace la OMS en sus últimas recomendaciones (WHO 2006), pero completándolos con estudios de PCR para diferenciar recaídas de reinfecciones. Si estos estudios no se pueden realizar, sería útil ajustar los resultados con la probabilidad de nuevas infecciones. Así la situación de la sensibilidad de algunos antipalúdicos estará más próxima a la realidad.

La posibilidad de poder determinar mediante PCR si se trata de verdaderas resistencias o por el contrario son reinfecciones prueba que esta metodología es práctica, de gran valor y útil para poder dar los resultados reales de los estudios de eficacia terapéutica. Algunos autores (Keffas y col., 2003) proponen el estudio de marcadores que permitan identificar si se trata de una reinfección o de una recrudescencia, es decir, la presencia de un parásito resistente al tratamiento empleado en ese momento. Dichos autores concluyen que la utilización de dos marcadores en países endémicos es suficiente para hacer esta diferenciación, mientras que por el contrario hay otros (Cattamachi y col., 2003) que incluso sugieren que el estudio de *msh-2* sería suficiente por su gran variabilidad. Estos mismos autores también alertan de los puntos débiles de la PCR, algunos mencionados previamente, y de las precauciones a la hora de interpretar los resultados. Por ejemplo la aparición de dos pares de muestras con patrones idénticos no representa sin ninguna duda una auténtica recrudescencia y cuando no se detecta por PCR un patrón genético determinado

no se puede excluir de manera definitiva su presencia en la muestra. En consecuencia tampoco se puede descartar una verdadera resistencia.

Otras limitaciones para diferenciar recaída de reinfección son las infecciones múltiples y el polimorfismo. Estos pueden evitarse con: el análisis de muestras consecutivas, utilizando otros loci (por ejemplo GLURP) o utilizando marcadores por microsatélite capaces de aumentar la probabilidad de detectar poblaciones de *P. falciparum* genéticamente diferentes. Esto demuestra los problemas con los que nos encontramos a la hora de interpretar estos estudios.

Para conocer de una forma teórica la presencia de poblaciones resistentes en una población determinada, es esencial el poder identificar mutaciones en genes que se sabe que están implicados en la resistencia a distintos antipalúdicos. Los genes usados con mayor frecuencia son *dhfr* y *dhps* implicados en la resistencia a S/P, *pfmdr-1* (gen de multirresistencia relacionado con la resistencia a cloroquina, mefloquina y se cree que tiene relación con artesunato) y *pfcr1* (implicado con la resistencia a cloroquina, y también se relaciona con la resistencia al artesunato como el anterior). La interpretación de los datos obtenidos del estudio de las mutaciones también tiene sus limitaciones. Siempre son datos teóricos, que a veces no presenta una relación total con lo obtenido en los estudios *in vivo* ya que existen otros factores que influyen sobre la efectividad de los antipalúdicos como puede ser la inmunidad de la población, la metabolización del medicamento, etc. En Guinea Ecuatorial hemos obtenido una tasa de mutación en ambos genes de hasta el 80 % para S/P (datos sin publicar), lo que no refleja la realidad ya que la resistencia detectada en los estudios *in vivo* realizados en Guinea en el año 2002 dan una tasa del 17%. Esto indica que aunque los parásitos sean resistentes genéticamente, otros factores (inmunidad, genes mutados colaborativos, etc.) pueden estar influyendo en la mayor eficacia del medicamento.

Para concluir, la utilización de la técnica de PCR ha ayudado a poder diferenciar entre los casos de reinfecciones y de recrudescencias (que sería los casos de verdadera resistencia), pudiendo ajustar los resultados de los estudios *in vivo* y acercándonos más a la realidad de lo que ocurre en el medio.

Los estudios moleculares realizados para diferenciar recaídas de reinfecciones nos dieron una idea de la gran variabilidad y multiplicidad genética del parásito en esta región. Para estudiar esta diversidad más detalladamente, aumentamos la muestra y realizamos estudios moleculares más amplios. Analizamos también la posible influencia en esta variabilidad de factores como la edad, la geografía o la resistencia a los antipalúdicos.

Mediante el estudio de diversos marcadores genéticos que presentan un determinado grado de polimorfismo, como los genes *msp-1* y *msp-2*, *GLURP*, *TRAP*, etc, se ha podido determinar que las infecciones por *Plasmodium falciparum* son una mezcla compleja de poblaciones de parásitos con diferentes características genotípicas (Conway & McBride 1991; Ntoumi et al. 1995). El número (multiplicidad) y la proporción relativa de las poblaciones (diversidad) presentes en la sangre en un momento determinado cambian sustancialmente de un individuo a otro o puede variar con el tiempo dentro de una misma persona, en función de la edad, la endemidad de la enfermedad o la transmisión (Färnet y col., 1997).

El conocer de una forma amplia la diversidad genética y la multiplicidad de infección de *Plasmodium falciparum* puede ayudarnos a entender los procesos patológicos del paludismo, los procesos de la inmunidad adquirida, la extensión y evolución de la farmacoresistencia, las condiciones de la transmisión y puede ayudar a establecer los programas de control del paludismo y al desarrollo de nuevas vacunas (Viriyakosol y col., 1995).

Cuando se pretende valorar las infecciones múltiples y la variabilidad genética mediante PCR hay que tener en cuenta que el número de alelos detectados es siempre el mínimo existente. Esto es debido a que hay infecciones de muy baja densidad donde la PCR no es capaz de detectar esos alelos, al secuestro del parásito en el momento del muestreo o a que un alelo muy frecuente puede suprimir la amplificación de otro que lo es menos (Felger y col., 1999b). Para evitar este problema diversos autores proponen la realización de análisis estadísticos para cuantificar esta baja sensibilidad (Smith y col., 1999b).

Tras la realización del presente estudio con muestras procedentes de Guinea Ecuatorial, se ha observado una alta multiplicidad de infección y una amplia variabilidad genética. Se han detectado un 90,2% de muestras con más de un parásito, es decir con infección múltiple, siendo el 80% múltiples para *msp-1* y 56,5% para *msp-2*. La media de parásitos fue de 2,81 (2,38 para *msp-1* y 2,04 para *msp-2*) y se llegaron a encontrar hasta 8 parásitos diferentes en una sola muestra. Estas cifras son similares a las encontradas en otros países de igual transmisión, tanto de África Central (Gabón con un 96% de MOI (Aubouy y col., 2003), Camerún con un 61,3% para *msp-2* (Basco y col., 2004)), como de otras regiones africanas: Senegal con 85% y 76% para *msp-1* y *msp-2* respectivamente (Konaté y col., 1999), Uganda con 78% y 64% (Peyerl-Hoffman y col., 2001) o Tanzania con 83% y 80% (Babiker y col., 1997). Sin embargo en áreas con una endemidad más baja esta multiplicidad alcanza cifras mucho menores, no encontrando más de 4 parásitos diferentes por muestra, tal y como queda referido en algunas áreas de Senegal (20% para *msp-1* y 2, 41% para *msp-1* y 38 para *msp-2*) (Babiker y col., 1997; Zwetyenga y col., 1998), zonas urbanas de Camerún (57% de MOI) (Basco y col., 2001), Brasil (44% de MOI, 15% para *msp-1* y 44% para *msp-2*) (Sallenave-Sales y col., 2000) o Tailandia (76% de MOI) (Snounou y col., 1999).

Si tenemos en cuenta la variabilidad genética del parásito, observamos unas cifras elevadas, detectándose 21 alelos para *msp-1* (11 para la familia K1, 9 para MAD20 y 1 para RO33) y 45 para *msp-2* (27 para FC27 y 18 para 3D7). Si comparamos estas cifras con las encontradas en los países de alta endemidad, mencionados anteriormente, vemos que, como en el caso de la multiplicidad, son similares. Así podemos encontrar en Uganda 19 alelos para *msp-1* (8 K1, 10 MAD20 y 1 RO33) y 24 para *msp-2* (12 para cada familia) (Peyerl-Hoffman y col., 2001), en Senegal 33 para *msp-1* (12 MAD20, 19 K1 y 2 RO33) (Konaté y col., 1999), o en Gabón 25 alelos para *msp-1* (8 MAD20, 14 K1 y 3 RO33) (Aubouy y col., 2003).

El tamaño de los alelos del gen *msp-1* hallados en Guinea Ecuatorial (125 a 500pb), es similar a los tamaños detectados en Gabón (Aubouy y col., 2003), Senegal o Tanzania (Babiker y col., 1997) donde se encontraron alelos con un tamaño comprendido entre 135 y 600pb. El rango o amplitud, entendiendo por ella la diferencia entre los alelos de menor y mayor tamaño, en los países mencionados anteriormente no llega a las 200pb y sin embargo en nuestro estudio supera las 300pb. En lo que se refiere a los tamaños de los alelos

del gen *msp-2*, en general son mayores que los del gen *msp-1* en todos los estudios realizados, incluido el nuestro. En los ensayos aquí analizados comprende entre 300 y 680pb, no superando por tanto las 700pb. En Guinea Ecuatorial para ambas familias de *msp-2* se han encontrado alelos de hasta 850pb, confirmando los resultados de estudios realizados en este país anteriormente (Tesis doctoral-datos no publicados). En nuestro estudio encontramos gran disparidad en el tamaño de los alelos tanto para el gen *msp-1* como *msp-2*, la mayor de todos los estudios analizados. Por lo tanto no sólo encontramos una gran variabilidad alélica, sino que además los alelos encontrados tienen unos tamaños únicos dentro de una escala muy amplia, hecho característico de nuestra área de estudio. La alta transmisión del paludismo que aquí se da, su tasa de inoculación entomológica (TIE) superior al de otras zonas (193 picaduras infectivas al año), puede explicar en parte esta peculiaridad. Este hecho, además del añadido que en Guinea la transmisión de la malaria es perenne al existir vectores de la enfermedad eficaces en las distintas épocas del año, corroboran esta amplia gama de alelos. Por este motivo si comparamos con estudios realizados en otras áreas cuya transmisión va de la perennidad a la estacionalidad, con TIEs mucho más bajas, podemos comprobar que las diferencias de tamaño y variabilidad en estos estudios son mucho menores. No obstante se ha observado que en países con similar nivel de transmisión que Guinea no se dan estas características. Por este motivo creemos que podían estar involucrados otros factores que influyen en este hecho, como: a) su peculiar distribución geográfica (una zona insular que mantiene determinados alelos y otra continental que recibe nuevos), b) el gran movimiento de población hacia otras regiones siempre volviendo al origen (favorecería la adquisición de nuevos alelos que se introducirían en la región de origen), c) el solapamiento de especies vectoras que permiten la transmisión, etc.

El estudio de la familia alélica FC27 del gen *msp-2* nos permite observar que tiene un comportamiento especial, debido a la elevada cantidad de alelos detectada (27) y al gran tamaño de alguno de ellos, de hasta 850pb. Esto nos indica que las poblaciones de *Plasmodium falciparum* que se han detectado en Guinea Ecuatorial son bastante características, ya que no se han encontrado alelos con un tamaño superior a 650pb en los países vecinos ni tampoco se ha detectado la alta variabilidad genética encontrada aquí. En Uganda (Peyerl-Hoffman y col., 2001) las cifras de variabilidad son similares para todas las familias tanto de *msp-1* como de *msp-2*, excepto en la familia FC27, que son menores. Sólo en un estudio realizado en una zona mesoendémica de Senegal (Schleiermacher y col., 2001) en mujeres embarazadas, el número de alelos diferentes detectados es superior a las encontradas en nuestro estudio para todas las familias, incluida la familia FC27. La inmunidad puede jugar un papel importante en que haya una alta variabilidad, y esto lo observamos en la familia FC27, ya que son los grupos con poca inmunidad (niños menores de 5 años, como se trata en nuestro caso) o con inmunidad alterada (embarazadas) los que tienen niveles más altos de variabilidad.

En las zonas en las que la transmisión de la enfermedad tiene una marcada estacionalidad se detecta que la variabilidad y la multiplicidad son menores. En estudios realizados en Sudán (Babiker y col., 1995) se encontraron 4 alelos diferentes de MAD20 y K1, mientras que para las familias 3D7 y FC27 del gen *msp-2* se encontraron 9 y 7 respectivamente; Mauritania (16) con un 49,1% de MOI; Papua Nueva Guinea (7) con

un 27% de MOI para *msp-2*; o Brasil (Sallenave-Sales y col., 2000) con 2 alelos de MAD20 y K1 y 11 para el total de *msp-2* y un 44% de MOI. Estos datos epidemiológicos sugieren que la multiplicidad y la variabilidad del *P. falciparum* están directamente relacionadas con la intensidad de la transmisión (Babiker y col., 1997; Conway y col, 1991a; Magesa y col, 2002; Zakeri y col., 2005; Lee y col., 2006) y que determina la estructura genética de la población parasitaria en las diferentes áreas endémicas. El nivel de endemidad del paludismo es estimado por la Tasa de Inoculación Entomológica (TIE) y los índices parasitológicos detectados en una determinada zona. En Guinea Ecuatorial la TIE es variable dependiendo de la región (continental o insular), la época del año (seca o lluviosa) y de la especie de mosquito. Todos estos factores hacen que la estacionalidad no afecte a la transmisión, ya que se alternan especies de mosquitos, de tal manera que se puede decir que en Guinea hay transmisión constante de la malaria durante todo el año. La transmisión, medida como TIE es muy elevada, pudiendo pasar de 40 picaduras infectivas al año durante la época lluviosa en la región continental para *A. funestus* hasta 787 para la misma especie en la región insular. La media es de 193 picaduras infectivas al año (Cano y col, 2004). El índice parasitológico es de 61,8% según los últimos estudios de prevalencia realizados en el año 2001 (datos no publicados). El que exista una transmisión constante permite la generación dentro del mosquito de más genotipos, ya que en él se produce la reproducción sexual del parásito, momento en el cual se da la recombinación genética. Este fenómeno de reproducción sexual hace que la creación de clones o la denominada clonalización, hecho frecuente dentro de los protozoos, no se produzca en el caso del plasmodio porque pasa necesariamente por esta fase de reproducción sexual que incluye la recombinación genética (Babiker et al. 1994). La fertilización cruzada o recombinación genética, es decir, la unión de gametocitos genéticamente distintos seguida de una recombinación en la meiosis, es el principal proceso por el cual se generan nuevas combinaciones genéticas (Ranford-Cartwright et al. 1993; Walliker et al. 1987; Wellems et al. 1990). De esta manera, cuando un humano recibe una picadura infectiva, con ella recibirá varias poblaciones diferentes del parásito y esto hace que el número de poblaciones circulantes en zonas de paludismo estable sea mayor que las existentes en zonas donde el paludismo tiene una época de transmisión estacional, ya que en las primeras el mosquito tiene un periodo de actividad continuo, y la generación de nuevos genotipos es constante (Babiker y col., 1997). La capacidad del *P. falciparum* para formar nuevos genotipos por cruzamiento o recombinación genética es ilimitada en países holoendémicos (como Guinea Ecuatorial), lo que hay que tener en cuenta a la hora de plantearse medidas de control.

Parece que la alta multiplicidad se relaciona con la alta variabilidad. Hoy se conoce que la transmisión multiclonal en una población de parásitos tiene un impacto directo en la frecuencia de recombinación y en la producción de nuevos genotipos (Babiker et al. 1997). La amplitud de la diversidad genética en un área, medida como el total de variaciones alélicas y el número medio de genotipos por infección, se relaciona con el nivel de endemidad del paludismo, lo mismo que la multiplicidad. La alta proporción de parásitos y el grado de inoculación produce un elevado nivel de incidencia (Molineaux 1985), lo cual permite una generación continua de nuevos genotipos. Está claro que el grado de multiplicidad y variabilidad varía según el contexto epidemiológico de la zona de estudio y está directamente relacionado

con la intensidad de la transmisión. De acuerdo con esto, parece lógico encontrar en nuestro estudio estos datos de prevalencia de infección múltiple y multiclonal teniendo en cuenta que cada individuo puede recibir casi 200 picaduras infectivas en un año, en una comunidad con una índice parasitémico de casi el 62%.

Hay autores que contradicen esta teoría, como es el caso de Zwetyenga y col (1998), quienes afirman que cuando se produce un aumento en la intensidad de transmisión no se traduce en un aumento paralelo del número de alelos. Estos autores opinan que en zonas de alta transmisión donde los individuos se comportan como semiinmunes, su sistema inmunológico juega un importante papel sobre la diversidad y multiplicidad de la infección limitando el desarrollo de determinadas poblaciones de parásitos, pero este hecho ocurre para individuos con un cierto grado de semiinmunidad como es el caso de los mayores de 10 años. En la adquisición de la inmunidad intervienen varios factores que interaccionan entre si, como la endemidad de la enfermedad, o la edad. Se ha podido observar una disminución de la multiplicidad en niños entre 10 y 15 años cuando son comparados con niños menores, debido a la inmunidad adquirida por la intensa y constante exposición a las infecciones por diferentes poblaciones de *Plasmodium falciparum* (Zwetyenga y col., 1998), a lo largo de su vida. Ntoumi y col (1995) obtuvieron resultados similares analizando la multiplicidad del gen *msp-2* en dos áreas de Tanzania, holo y mesoendémica respectivamente y en dos grupos de edad (mayor y menor de 15 años). En zona holoendémica el grupo menor de 15 años tuvo una media de parásitos de 4 y un porcentaje de poblaciones múltiples del 85%. En el grupo de mayores de 15 años la media fue de 2 y el porcentaje de 33%. Como en el caso anterior los autores implican a la inmunidad adquirida como la responsable de limitar las poblaciones de un amplio número de parásitos inoculados, y controlar no sólo la carga de parásitos sino la aparición de algunos genotipos específicos (que no están en el grupo de mayor edad). En este mismo estudio en zona mesoendémica no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos de edad.

En la misma área geográfica que en el caso anterior se realizó un estudio estratificando por edad (Konate y col., 1999), obteniéndose un resultado similar. En otros estudios se ha podido observar que el aumento de la multiplicidad va en paralelo a la edad hasta los 9 años (Babiker y col., 1999), los 5 (Smith y col., 1999a; Basco y col., 2001) o los 3 (Henning y col., 2003), sin embargo cuando se trata de adultos (Basco y col., 2001), esta relación se pierde. Otro dato a favor de la influencia de la inmunidad se apoya mediante estudios realizado en países con menor endemidad, como Brasil o Vietnam (Hoffmann y col., 2001) donde se puede observar que con la edad no se reduce la multiplicidad, al menos en pacientes sintomáticos.

Por el contrario en nuestro estudio, realizado en una población de niños menores de 5 años, no hemos encontrado relación entre la edad y la multiplicidad de infección. Estratificando la muestra por años, no hay diferencias significativas entre ningún grupo comparando porcentaje de multiplicidad, media de parásitos por muestra o número máximo de parásitos encontrados en una muestra. La inmunidad frente al plasmodio empieza a ser eficaz a partir de los 5 años, por tanto no podemos determinar si en nuestro caso el sistema inmune realiza un control del parásito, por tanto, nuestros datos no cuestionan la relación de la inmunidad con el control del parásito. Si nos ceñimos a nuestros resultados parece evidente que la inmunidad

que se va adquiriendo hasta los 5 años no limita ni favorece la multiplicidad o la variabilidad del parásito, es decir, no influye en su historia natural. A partir de los 5 años, si realmente se crea una respuesta parcial genotipo-específica, como afirman Babiker y col (1999), debería disminuir la multiplicidad, la variabilidad de alelos e incluso determinados genotipos, manteniéndose un número más o menos constante de parásitos que podrían proteger al individuo de cuadros clínicos graves (pre inmunización). En nuestro caso se observa una tendencia a la disminución de la presencia de las familias 3D7 y FC27 de *msp-2* lo que nos puede indicar que hay unos genotipos más sensibles que otros a la inmunidad. De hecho, como ya hemos indicado, la familia FC27 aparece con más frecuencia en grupos con inmunidad deficiente. Por el contrario, en un estudio realizado en Tanzania por Henning y col. (2003) en niños de entre 0 a 6 años de edad, la familia FC27 apenas aparece en menores de dos años, indicando que son más eficaces evadiendo la respuesta inmune en el caso de edades mayores. Por tanto creemos necesario el desarrollo de estudios genotípicos en grupos de diferentes edades para poder determinar la verdadera influencia de la inmunidad en la estructura poblacional del parásito, al menos en nuestra área de estudio.

En la línea de factores que influyen en la inmunidad tendríamos también que tener en cuenta la densidad parasitaria encontrada en la población. No existe unanimidad en la literatura con la relación entre multiplicidad de infección y la densidad parasitaria. Hay estudios que indican que una mayor densidad no implica una mayor multiplicidad (Basco y col., 2001; Conway y col., 1999a). En un estudio realizado en Tanzania (Färnet y col., 1997) se llevó a cabo un seguimiento diario de la densidad parasitaria y del patrón genotípico de los niños enfermos y se observó que estos variaban incluso de una hora a otra del día. A pesar de esta variabilidad, el aumento de la multiplicidad no se correspondía con el de la densidad en ningún momento. Con los datos obtenidos en nuestro estudio no se detecta una relación entre densidad y multiplicidad cuando tenemos en cuenta muestras con infección simple o múltiple. Sin embargo la densidad aumenta de forma significativa cuando tenemos en cuenta el número de parásitos, tanto para los genes de *msp-1* y *msp-2* como para la población en general. Esta relación si es proporcional hasta los 5 parásitos por muestra (Fig.16). El tamaño de las muestras que contienen más de 5 parásitos es pequeño no pudiendo sacar ningún dato concluyente. Esta proporcionalidad apoya la afirmación anterior ya que por la edad de la población de nuestro estudio (menores de 5 años), ésta todavía no ha adquirido el suficiente nivel de inmunidad que pudiera estar influyendo en la densidad parasitaria.

Por el contrario hay estudios que si apoyan la existencia de una relación entre la multiplicidad y la densidad parasitaria, observándose en general un aumento de la multiplicidad con la densidad parasitaria (Ntoumi y col., 1995; Peyerl-Hoffman y col., 2001; Felger y col., 1999a). Smith y col (1999c) detectaron una relación directa entre multiplicidad y densidad parasitaria, además de relacionar ambos parámetros con la inmunidad. Se produce un control genotipo-específico de la inmunidad, como mencionamos anteriormente, que hace que se multipliquen de distinta forma los clones diferentes y por tanto el aumento de la multiplicidad y la densidad parasitaria no se produzca de forma proporcional. Cuando el estudio se realiza en niños menores de un año se ve que el aumento de la densidad si es proporcional a la multiplicidad, lo que podría confirmar la selección producida por la inmunidad.

En nuestro estudio hemos analizado también la influencia de los factores tiempo y espacio en la variabilidad y multiplicidad. Desde el año 1999 hasta el año 2001 en la ciudad de Malabo se intensificaron las acciones de la lucha contra el paludismo tanto por parte de Gobierno como por los proyectos no gubernamentales allí existentes. Se realizaron en la ciudad una serie de mejoras urbanísticas como es el asfaltado de las calles (evitando posibles criaderos del vector de la malaria), y otras acciones que tenían su efecto sobre la salud pública que indudablemente ha influido sobre el paludismo, contribuyendo a disminuir la prevalencia de la enfermedad (Henning y col., 2003). Estas mejoras concretas en la ciudad de Malabo hacen que la comparación entre el año 1999 y el 2001 se vea más influenciado por factores externos no pudiéndose atribuir las posibles diferencias sólo al paso del tiempo.

Los estudios que se han realizado para detectar diferencias temporales en las poblaciones parasitarias son muy heterogéneos. En algunos casos cuando el periodo de estudio era menor a 2 años (Silva y col., 2000) nos se detectaban diferencias, y en otros estudios en los que el periodo de tiempo llegaba hasta los 7 años tampoco se detecta.

Babiker y col. (1995) en un estudio realizado en distintas aldeas de Sudan a lo largo de 3 años, se detectaron diferencias temporales en determinados alelos de la familia MAD-20 y RO33 del gen *msp-1*. Concluyen que esta fluctuación puede deberse a una selección inmuno-dependiente, es decir, los residentes de un área van creando inmunidad hacia un alelo en concreto y hacen que su frecuencia disminuya. También el movimiento de la población puede introducir nuevos alelos o aquellos que son poco frecuentes no ser detectados en un año pero si en otro. Parece, sin embargo, que es necesario el seguimiento durante un tiempo relativamente prolongado (al menos 3 años) para poder detectar el posible cambio en la población parasitaria. Durante ese periodo cabe la posibilidad de que se introduzcan medidas de control que podrían también causar *per se* un cambio en la frecuencia de las diferentes familias parasitarias, como es el caso de la ciudad de Malabo entre los años 1999 y 2001. De esta manera no se estarían sólo detectando cambios a causa del paso del tiempo sino por factores como el control de la enfermedad.

En lugares como Guinea Ecuatorial donde se están produciendo grandes cambios en las infraestructuras de las ciudades, así como establecimientos de medidas de control de la enfermedad, los estudios de las modificaciones debidas al factor temporal no tienen mucho sentido y en general no nos proporcionan ninguna información valiosa para las futuras actuaciones de control.

En nuestro caso sería más efectivo comparar las dos ciudades en dos momentos distintos: Malabo en el año 1999 y Bata en el año 2001, ya que en ese momento ambas tenían una situación sanitaria y urbanística similar. Las variaciones que se puedan producir en diferentes áreas geográficas pueden conllevar cambios de actitud en los proyectos de control. En esta comparación observamos que en Bata hay una mayor prevalencia de malaria que en Malabo, por tanto esto se traduce en una mayor multiplicidad ya que el MOI es significativamente mayor y hay un mayor número de parásitos por muestra. Hay algunas familias de alelos que aparecen con más frecuencia como MAD-20 y RO33. Además de una mayor cantidad de parásitos, hemos observado la aparición en Bata de determinados alelos de la familia FC27 y de MAD20 que no aparecen en Malabo ni en el año 1999 ni en el 2001, como son el de 200 pb, 675pb, 700pb, 725pb, y 775pb

de la familia FC27 o 500pb de MAD20. También encontramos en Bata, de manera significativamente mayor, los genotipos FC27-MAD20 y 3D7-MAD20, es decir la población parasitaria de Bata y Malabo difieren en su cantidad (multiplicidad) y en su calidad (variabilidad).

Estas diferencias parecen demostrar que las poblaciones parasitarias difieren de unas zonas a otras, incluso en el mismo país. En la literatura se encuentran claras diferencias entre países con diferentes grados de endemicidad como Brasil y Tanzania (Hoffmann y col., 2001) o con localizaciones muy distantes como Brasil y Madagascar (Sallenave-Sales y col., 2000) o Brasil y Vietnam (Hoffmann y col., 2001). En otros estudios realizados en un mismo país los resultados son contradictorios. Jordan y col. (2001) no encuentran diferencias entre poblaciones cercanas en Mauritania, probable-mente debido a esa cercanía y al movimiento de la población entre las dos áreas que permite el intercambio de poblaciones parasitarias igualando ambas. Lo mismo ocurre en un estudio llevado a cabo en Uganda por Peyerl-Hoffmann y col. (2001) donde comparan áreas con diferente endemicidad y tampoco encuentran diferencias. En la línea de nuestro análisis Konate y col. (1999) estudiaron la población parasitaria en dos pueblos de Senegal (Ndiop y Dielmo) con diferentes endemicidades. Se encuentran diferencias significativas con algunas familias como K1 y MAD20, detectando algunos alelos (210pb de MAD20) con frecuencia en un pueblo y en el otro no. En nuestro caso al tratarse de dos zonas de Guinea Ecuatorial, separadas geográficamente, Malabo en la isla de Bioko y Bata en la región continental, permite que existan diferencias claras en la multiplicidad y en la variabilidad del parásito, ya que el intercambio de alelos entre las dos zonas es bastante más complicado que en áreas que fueran limítrofes.

Esto nos permite afirmar que para poder establecer intervenciones, en las que se intenta proporcionar a la población de una inmunidad parcial o total hacía la enfermedad, como los ensayos de vacunas basados en antígenos de estadios eritrocíticos del parásito, deberían hacerse teniendo en cuenta la estructura genética del parásito a nivel local, usando los alelos mayoritarios de una determinada área, de tal manera que la posible vacuna sea más eficaz en un área que en otra en donde la estructura genética del parásito es distinta o tiene otro patrón. Por tanto y en este caso, sería necesario hacer estudios de población del parásito de manera local y tener mucha precaución al trasladar los resultados de un área a otra, aunque se trate de un mismo país. Por ejemplo en nuestro caso cualquier medida que tenga incidencia sobre el alelo MAD20 será más eficaz controlando el paludismo en Bata que en Malabo por ser éste más frecuente en la primera.

Conocer cómo afectan las medidas de control sobre la estructura parasitaria también es importante. Smith y col. estiman que medidas que disminuyan la intensidad de la transmisión, como la utilización de telas mosquiteras impregnadas, reducirían la multiplicidad de manera proporcional a la disminución de la transmisión. En nuestro estudio comparamos los datos de Malabo durante el año 1999 con los de la misma ciudad en el año 2001, después de tomar una serie de medidas de control y urbanización que disminuyeron la transmisión. En la comparación de las dos ciudades en esos años podemos observar que en el año 1999 hay una mayor presencia de alelos de *msp-2*.

Observamos que sí se podría producir competencia entre las familias alélicas de un mismo gen. En el caso del gen *msp-1*, no hemos encontrado diferencias significativas entre estas familias y por tanto

podríamos decir que estas medidas no inciden más en unos alelos que en otros, sino que todos han disminuido de igual manera. Podemos afirmar que no ha habido una selección de alelos, como ocurría en el estudio de Maitland y col., (2000). En dicho estudio, realizado en la isla de Santo (Vanuatu) de pequeñas dimensiones y en una zona límite del cinturón del paludismo en el Pacífico Sur, se detecta una diversidad parasitaria muy limitada (5 alelos para el gen *msh-1* y 5 para el de *msh-2*). Aquí la evolución genética del parásito se puede seguir por su alto grado de aislamiento. De esta manera se pudo comprobar que se producía una selección de determinados alelos asociados a la resistencia del parásito frente al antipalúdico, que aumentaría mucho su prevalencia, extinguiendo aquellos alelos raros. En el caso de la isla de Bioko, su tamaño poblacional es similar, sin embargo su aislamiento es mucho menor y su endemidad mucho mayor. En los últimos años (en los que realizaron nuestros estudios) la migración de personas desde el continente a la capital, situada en la isla, y desde la isla a otros países y de nuevo a la isla, hace que esa selección sea mucho más improbable, además este movimiento poblacional permite la introducción de nuevas poblaciones, aumentando el *pool* de alelos circulantes, aunque en menor medida que si fueran zonas limítrofes.

Otro aspecto importante que hemos querido reflejar en nuestro estudio es la relación existente entre la cantidad o calidad del parásito y la severidad de la enfermedad que produce. Ya en estudios realizados a principios de los años 90 (Conway y col., 1991), se busca una relación entre la multiplicidad de infección y la severidad de la enfermedad, no hallándose en este caso ninguna. En el año 1996, Robert y col. realizaron un estudio en Senegal que intentaba dar respuesta a esta hipótesis. Compararon parásitos aislados de pacientes con malaria severa con otros procedentes de pacientes con una clínica más leve. Concluyen que una mayor multiplicidad podría proteger, ya que encontraron que ésta era menor en los casos severos. A partir de este estudio se han realizado muchos otros donde se confirma dicha hipótesis. En el año 2002 (Magesa y col.) se realizó en Tanzania un estudio en niños de 1 a 5 años confirmando lo anteriormente dicho, es decir, un niño con una alta multiplicidad se supone tiene un espectro de memoria inmunológica más amplio que con una multiplicidad menor y por tanto está más protegido. Cuando se estudia en niños menores de 1 año (Felger y col., 1999), al estar en estadios tan precoces del desarrollo de la inmunidad, cualquier infección nueva puede causar fiebre. Es en niños mayores, con alguna inmunidad adquirida, donde las nuevas infecciones no desencadenan la cascada pirogénica, y los nuevos parásitos van ampliando el espectro protector. Según Smith y col (1999c) esta protección que da la alta multiplicidad tiene implicaciones importantes para comprender la inmunidad del *Plasmodium falciparum*, su nicho ecológico y el impacto ecológico de las intervenciones. En este sentido Beck y col (1997) analizan el polimorfismo de *msh-2* en niños vacunados en Tanzania con la SPf66 y en aquellos que no lo están. Observó que la multiplicidad en los asintomáticos vacunados era mucho menor que los asintomáticos no vacunados, lo que en un momento dado podría resultar negativo si tenemos en cuenta los estudios que afirman que una elevada multiplicidad confiere inmunidad cruzada y determina la especificidad de los mecanismos inmunes frente a nuevas infecciones.

En nuestro estudio, sin embargo, hemos encontrado que aquellos casos complicados tenían una serie de características específicas con respecto a la variabilidad del plasmodio, como un mayor número de

parásitos tanto para *msp-1* como para *msp-2* y MOI más elevado para este último. El número de alelos diferentes encontrados para todas las familias, tanto de *msp-1* como de *msp-2* es, sin embargo, menor que en los complicados, lo que nos podría estar indicando la existencia de una serie de alelos más virulentos asociados a los casos complicados. En la revisión sobre la multiplicidad mencionada anteriormente, Haywood y col (1999) también encuentran en los niños vacunados con SPf66 un menor número de parásitos, sin embargo la cantidad de ataques de malaria es la misma que en los no vacunados. Parecería, por tanto que existe una serie de alelos más virulentos que producen la clínica e incluso las complicaciones. En este sentido nosotros hemos encontrado que la familia MAD20 y algunos alelos específicos de la familia FC27 (de 600 y 800 pb) aparecen de manera significativa en mayor número en los casos complicados. En un estudio realizado en Papúa Nueva Guinea (Engelbrecht y col., 1995) donde sólo se analizó la presencia de familias del gen *msp-2*, encuentran que la aparición de FC27 es dos veces más frecuente en sintomáticos que en asintomáticos y Al-Yaman y col., (1997) encuentran esta diferencia en aquellos niños con malaria cerebral que morían. A partir de estos estudios en el año 2003 Henning y col., realizaron un estudio en Tanzania con niños de 1 a 6 años, concluyendo que la proporción de FC27 es mayor en sintomáticos ya que esta familia tiene la característica de evadir la respuesta inmune del hospedador y por tanto la capacidad de ser virulento.

Otros apoyan la relación entre paludismo complicado y MAD20, como el realizado en Tanzania (Magesa y col., 2002), donde esta familia aparece relacionada con los casos de fiebre o en la India (Ranjit y col., 2004) donde se relaciona con casos severos. La relación de las otras familias de los genes *msp-1* y *2* con la gravedad de infección está más confusa en la literatura. Con respecto a la familia R033 hay estudios en los que se observa que confiere una clara protección (Al Yaman y col., 1997; Kun y col., 1998) y otros estudios donde es evidente que no protege (Robert y col., 1996). La familia 3D7 tiene las mismas contradicciones, en algunos casos aparece con más frecuencia en la malaria severa (Ranjit y col., 2004; Magesa y col., 2002) y en otros parece que protege (Al Yaman y col., 1997; Henning y col., 2003).

Con todos estos datos podemos deducir que la adquisición de nuevos parásitos (reflejado como multiplicidad de infección) va proporcionando una inmunidad necesaria para proteger al individuo de infecciones graves y con el tiempo incluso de ataques clínicos. Así durante la infancia, el tener una multiplicidad elevada puede producir clínica hasta que se adquiera esa inmunidad protectora, lo que hace que con la años la alta multiplicidad produzca protección y no clínica. Esto se ve claramente en los vacunados con SPf66, donde la multiplicidad es inferior que en los no vacunados ya que ellos han adquirido la inmunidad de manera artificial no necesitando la infección parasitaria para adquirirla.

Sin embargo parece que existen algunos genotipos que son los responsables de la clínica o de la complicación de la enfermedad, que aparecen en grandes cantidades tanto en vacunados como no. Dichos genotipos no estarían incluidos como antígenos en la vacuna SPf66.

Creemos por tanto que un estudio en profundidad de la virulencia de las diferentes familias alélicas podría facilitar la elaboración de una vacuna que al menos evitara los casos complicados, una vacuna que incluyera los alelos mayoritarios de una zona, y que además estuvieran relacionados con la malaria grave,

eso sí, sería una vacuna eficaz en la zona de la que proceden dichos alelos y no en otras donde pueden existir otros de forma mayoritaria. Si tenemos en cuenta los resultados de nuestro estudio y de la mayoría de los ensayos revisados, vemos que tanto la familia MAD20 como la FC27 podrían tener relación con la gravedad de la infección, y podrían ser utilizados dichos genotipos para la creación de una vacuna, al menos en las zonas estudiadas, de tal manera que se ve la importancia del estudio geográfico de la variabilidad genética del parásito a la hora de diseñar una vacuna.

Por último, en cuanto a la relación entre la genética del parásito y su sensibilidad a los antipalúdicos existen escasos estudios basados en dicha relación, siendo un estudio de Lee y col. (2006) realizado en Uganda el más completo. Encontraron que las muestras con parásitos resistentes a los antipalúdicos tenían un mayor número de parásitos, sin influir el tipo de medicamento utilizado en el tratamiento. Concluyen que una disminución de la multiplicidad mejoraría la respuesta al tratamiento, independientemente de factores del parásito o el huésped. En nuestro estudio también encontramos una mayor multiplicidad en los resistentes, aunque sólo para *msp-1*, por tanto podría valer la conclusión del estudio anterior, favoreciendo la respuesta al tratamiento aquellas acciones de control que disminuyan la multiplicidad.

En nuestro estudio hemos encontrado que en los casos de resistencia a la cloroquina y la S/P aparece con más frecuencia el alelo K₁ 225, además se observa que los genotipos FC27-RO33 y FC27-MAD20 son más prevalentes en los casos en los que hay resistencia a cualquiera de los tres fármacos. Nuestra muestra no es suficientemente grande para sacar una clara conclusión, pero si nos pone sobre la pista de un posible factor relacionado con la resistencia, es decir, podrían existir genotipos o alelos relacionados con ésta. También habría que tenerlo en cuenta al diseñar una vacuna ya que incluir alguno de estos genotipos facilitaría el tratamiento y evitaría la aparición de resistencias en aquellas personas vacunadas que enfermaran.

6. CONCLUSIONES

- 1.- El nivel de resistencia de los medicamentos de 1ª y 2ª línea para el tratamiento del paludismo no complicado (cloroquina y sulfadoxina/pirimetamina) tanto en Bata como en Malabo, han superado los límites considerados como aceptables, teniendo además su utilización consecuencias clínicas negativas, por ello estos medicamentos deberían ser sustituidos por otros de mayor eficacia.
- 2.- La quinina mantiene su eficacia frente a *Plasmodium falciparum* en Guinea Ecuatorial, aunque su utilización se debe mantener para el tratamiento del paludismo complicado.
- 3.- La respuesta de la terapia combinada con artesunato en Guinea Ecuatorial ha sido muy eficaz, tanto en la evolución de la parasitemia como en la prevalencia de los gametos o la recuperación hematológica.
- 4.- La utilización de marcadores moleculares de variabilidad (*msh-1* y *msh-2*) han sido buenas herramientas para diferenciar resistencias de reinfección en los estudios de eficacia terapéutica a 28 días, por lo que se recomienda su utilización en dichas pruebas.
- 5.- En Guinea Ecuatorial, área de altas tasas de picaduras infectivas por año, los pacientes presentan una elevada multiplicidad de infección y la población de *Plasmodium falciparum* posee una alta variabilidad genética.
- 6.- En relación con la variabilidad genética, hemos encontrado tamaños de alelos tanto para las familias del gen *msh-1* y *msh-2*, característicos de esta zona, así como una amplitud de dicho tamaño sólo encontrada en Guinea Ecuatorial.
- 7.- No hemos encontrado relación entre la edad (hasta 5 años) y la multiplicidad de infección o la variabilidad genética.
- 8.- La densidad parasitaria aumenta de forma significativa con el aumento del número de poblaciones parasitarias.
- 9.- Hemos encontrado diferencias geográficas significativas en las poblaciones parasitarias de Bata y Malabo, tanto en la multiplicidad de infección como en la variabilidad.
- 10.- Los parásitos encontrados en infecciones complicadas tienen una serie de características genéticas específicas, como mayor frecuencia de aparición del alelo MAD20 y FC27, hecho que puede ser importante a la hora de diseñar medidas de control basadas en la utilización de estos antígenos.
- 11.- Al existir una mayor multiplicidad en las muestras de *Plasmodium falciparum* resistente al tratamiento, aquellas medidas encaminadas a disminuir la intensidad de transmisión (utilización de telas mosquiteras, rociamiento de insecticidas intradomiciliario, profilaxis en embarazadas, etc.) favorecerán la respuesta terapéutica.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- **Achidi EA, Ajua A, Kimbi HK, Sinju CM.** (2005). In vivo efficacy study of quinine sulphate in the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in patients from Southwestern Cameroon. *East Afr Med J.* Apr; 82(4):181-5.
- **Adam I, Osman ME, Elghzali G, Ahmed GI, Gustafssons LL, Elbashir MI.** (2004). Efficacies of chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine and quinine in the treatment of uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria in eastern Sudan. *Ann Trop Med Parasitol.* Oct; 98(7):661-6.
- **Al Yaman, F., Genton, B., Taraika, J., Anders, R., y Alpers, M.P.** (1997). Cellular immunity to merozoite surface protein 2 (FC27 and 3D7) in Papua New Guinean children. Temporal variation and relation to clinical and parasitological status. *Parasite Immunol.*, **19**, 207-214.
- **Al Yaman, F., Genton, Reeder J.C., Mokela D., Anders, R., y Alpers, M.P.** (1997). Humoral response to defined *Plasmodium falciparum* antigens in cerebral and complicated malaria and their relationship to parasite genotype. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **56**, 430-435.
- **Al Yaman, F., Genton, Reeder J.C., Anders, R., Smith T., Alpers, M.P.** (1997). Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **91**, 602-605.
- **Ariey,F., Chalvet,W., Hommel,D., Peneau,C., Hulin,A., Mercereau-Puijalon,O., Duchemin,J.B., Sarthou,J.L., Reynes,J.M., y Fandeur,T.** (1999). *Plasmodium falciparum* parasites in French Guinea: limited genetic diversity and high selfing rate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **61**, 978-985.
- **Arnot,D.** (1998). Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **92**, 580-585.
- **Athan E, Durrheim DN, Barnes K, Mngomezulu NM, Mabuza A, Govere J.** (2001). Effectiveness of short-course quinine and single-dose sulfadoxine-pyrimethamine in the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Mpumalanga Province, South Africa. *S Afr Med J.* Jul; 91(7):592-4.
- **Aubouy A., Migot- Nabias F., Deloron P.** (2003). Polymorphism in two merozoite surface proteins of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon. *Malaria Journal.* **2**:12
- **Babiker,H.A., Ranford-Cartwright,L.C., Currie,D., Charlwood,J.D., Billingsley,P., Teuscher,T., y Walliker,D.** (1994). Random mating in a natural population of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, **109** (Pt 4), 413-421.
- **Babiker,H., Satti,G., Walliker,D.** (1995). Genetic changes in the population of *Plasmodium falciparum* in a sudanese village over a three-year. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **53**, 7-15.
- **Babiker,H.A., Lines,J., Hill,W.G., Walliker,D.** (1997). Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in east Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **56**, 141-147.

- **Babiker,H.A.** (1998). Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. *Plasmodium falciparum* population in the unstable malaria area of eastern Sudan is stable and genetically complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92, 585-589.
- **Babiker,H.A., Abdel-Muhsin,A.M., Ranford-Cartwright,L.C., Satti,G., y Walliker,D.** (1998). Characteristics of *Plasmodium falciparum* parasites that survive the lengthy dry season in eastern Sudan where malaria transmission is markedly seasonal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59, 582-590.
- **Babiker,H.A., Ranford-Cartwright,L.C., Walliker,D.** (1999). Genetic structure and dynamics of *Plasmodium falciparum* infections in the Kilombero region of Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93, 11-15.
- **Bannister,L.H. y Dluzewski,A.R.** (1990). The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: a review. *Blood Cells*, 16, 257-292.
- **Basco,L.K. y Ringwald,P.** (2000b). Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VII. Analysis of recrudescence and reinfection in patients with uncomplicated falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63, 215-221.
- **Basco,L.K. y Ringwald,P.** (2001). Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VIII. Multiple *Plasmodium falciparum* infections in symptomatic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65, 798-803.
- **Basco LK, Tahar R, Escalante A** (2004). Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVIII. Polymorphisms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 gene in isolates from symptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg.*;70(3):238-44.
- **Basco LK, Ngane VF, Ndounga M, Same-Ekobo A, Youmba JC, Abodo RT, Soula G.** (2006). Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXI. Baseline therapeutic efficacy of chloroquine, amodiaquine, and sulfadoxine-pyrimethamine monotherapies in children before national drug policy change. *Am J Trop Med Hyg.*; 75(3):388-95.
- **Beck,H.P.** (1999). How does molecular epidemiology help to understand malaria? *Trop. Med. Int. Health*, 4, 1-3.
- **Beck,H.P., Felger,I., Huber,W., Steiger,S., Smith,T., Weiss,N., Alonso,P., y Tanner,M.** (1997). Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine SPf66. *J. Infect. Dis.*, 175, 921-926.
- **Blackman,M.J. y Holder,A.A.** (1992a). Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 50, 307-315.
- **Bruce-Chwatt,L.J.** (1986). Malaria vaccine trials: a guided step into the unknown. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 66, 5-13.

- **Cano J, Berzosa PJ, Roche J, Rubio JM, Moyano E, Guerra-Neira A, Brochero H, Mico M, Edu M., Benito A.** (2004) Malaria Vectors in the Bioko Island (Equatorial Guinea): Stimulation of vector dynamics and transmission intensities. *Journal of Medical Entomology*, 41(2): 158-162.
- **Cattamanchi A, Kyabayinze D, Hubbard A, Rosenthal PJ, Dorsey G.** (2003). Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of msp-1, msp-2, and glurp. *Am J Trop Med Hyg.*; 68(2):133-9.
- **Cavanagh,D.R., Elhassan,I.M., Roper,C., Robinson,V.J., Giha,H., Holder,A.A., Hviid,L., Theander,T.G., Arnot,D.E., y McBride,J.S.** (1998). A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *J. Immunol.*, 161, 347-359.
- **Contamin H, Fandeur T, Bonnefoy S, Skouri F, Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O** (1995). PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*. *J Clin Microbiol.*;33(4):944-51.
- **Conway,D.J., Greenwood,B.M., y McBride,J.S.** (1991a). The epidemiology of multiple-clone *Plasmodium falciparum* infections in Gambian patients. *Parasitology*, 103 Pt 1, 1-6.
- **Conway,D.J., Greenwood,B.M., y McBride,J.S.** (1992). Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* polymorphic antigens in a malaria-endemic population. *Infect. Immun.*, 60, 1122-1127.
- **Conway,D.J. y McBride,J.S.** (1991). Genetic evidence for the importance of interrupted feeding by mosquitoes in the transmission of malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 85, 454-456.
- **Conway,D.J., Roper,C., Oduola,A.M., Arnot,D.E., Kremsner,P.G., Grobusch,M.P., Curtis,C.F., y Greenwood,B.M.** (1999). High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 96, 4506-4511.
- **Coulibaly SO, Nezien D, Traore S, Kone B, Magnussen P.** (2006). Therapeutic efficacy of sulphadoxine-pyrimethamine and chloroquine for the treatment of uncomplicated malaria in pregnancy in Burkina Faso. *Malar J.* Jun 15; 5:49.
- **Creasey,A., Fenton,B., Walker,A., Thaithong,S., Oliveira,S., Mutambu,S., y Walliker,D.** (1990). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 42, 403-413.
- **Daubersies,P., Sallenave-Sales,S., Trape,J.F., Raharimalala,L., Rogier,C., Contamin,H., Fandeur,T., Daniel-Ribeiro,C.T., Mercereau-Puijalon,O., y Druilhe,P.** (1994). PCR characterization of isolates from various endemic areas: diversity and turn over of *Plasmodium falciparum* populations are correlated with transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 89 Suppl 2, 9-12.
- **Duraisingh,M.T., Drakeley,C.J., Muller,O., Bailey,R., Snounou,G., Targett,G.A., Greenwood,B.M., y Warhurst,D.C.** (1997). Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the pfm-dr 1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology*, 114 (Pt 3), 205-211.

- **Ekvall H., Premji Z., Bjorman A.** (1998). Chloroquine treatment for uncomplicated childhood malaria in an area with drug resistance: early treatment failure aggravates anemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 92 (5):556-60.
- **Engelbrecht F., Felger I., Genton B., Alpers M., Beck H.P.** (1995). *Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp. Parasitology*, 81: 90-96.
- **Esamai F, Tenge CN, Ayuo PO, Ong'or WO, Obala A, Jakait B.** (2005). A randomized open label clinical trial to compare the efficacy and safety of intravenous quinine followed by oral malarone vs. intravenous quinine followed by oral quinine in the treatment of severe malaria. *J Trop Pediatr.* Feb; 51(1):17-24.
- **Färnet A., Snounou G., Rooth I., Bjorman A.** (1997). Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am J Trop Med Hyg*, 56 (5); 538-547.
- **Felger I., Tavul L., Kabintik S., Marshall V., Genton B., Alpers M., y Beck H.P.** (1994). *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. *Exp. Parasitol.*, 79, 106-116.
- **Felger I., Irion A., Steiger S., Beck, H.P.** (1999b). Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93 Suppl 1, 3-11.
- **Felger I., Smith T., Edoh D., Kitua A., Alonso P., Tanner M., Beck H.P.** (1999a). Multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian infants. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93 Suppl 1, 29-34.
- **Fenton B., Clark J.T., Khan C.M., Robinson J.V., Walliker D., Ridley R., Scaife J.G., McBride J.S.** (1991). Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Cell Biol.*, 11, 963-974.
- **Fenton B. y Walliker D.** (1990). Genetic analysis of polymorphic proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genet. Res.*, 55, 81-86.
- **Ferreira ID, Rosário VE, Cravo PV.** (2006). Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* Jan 18; 5:1.
- **Ferreira M.U., Liu Q., Kaneko O., Kimura M., Tanabe K., Kimura E.A., Katzin A.M., Isomura S., y Kawamoto, F.** (1998). Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the southwestern Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59, 474-480.
- **Fidock D.A., Nomura T., Cooper R.A., Su X., Talley A.K., y Wellems T.E.** (2000). Allelic modifications of the *cg2* and *cg1* genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 110, 1-10.

- **Gerold,P., Dieckmann-Schuppert,A., y Schwarz,R.T.** (1994). Glycosylphosphatidylinositols synthesized by asexual erythrocytic stages of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. Candidates for plasmodial glycosylphosphatidylinositol membrane anchor precursors and pathogenicity factors. *J. Biol. Chem.*, 269, 2597-2606.
- **Gerold P., Jung N., Azzouz N., Freiberg N., Kobe S., y Schwarz R.T.** (1999). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum* in a cell-free incubation system: inositol acylation is needed for mannosylation of glycosylphosphatidylinositols. *Biochem. J.*, 344 Pt 3, 731-738.
- **Gilles HM, WarrelDA.** (1993). Essential Malariology (3er Edition). Ed. Arnold.
- **Ginsburg H.** (2005). Should chloroquine be laid to rest? *Acta Trop.* Oct;96(1):16-23.
- **Golenda,C.F., Li,J., y Rosenberg,R.** (1997). Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 94, 6786-6791.ç
- **Grandesso F, Bachy C, Donam I, Ntambi JH, Habimana J, D'Alessandro U, Maikere J, Vanlerberghe V, Kerahe CH, Guthmann JP.** (2006). Efficacy of chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria among children under five in Bongor and Koumra, Chad. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* May;100(5):419-26.
- **Guiguemde,T.R., Aouba,A., Ouedraogo,J.B., y Lamizana,L.** (1994). Ten-year surveillance of drug-resistant malaria in Burkina Faso (1982-1991). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50, 699-704.
- **Guthmann JP, Ampuero J, Fortes F, van Overmeir C, Gaboulaud V, Tobback S, Dunand J, Saraiva N, Gillet P, Franco J, Denoncin A, van Herp M, Balkan S, Dujardin JC, D'Alessandro U, Legros D.** (2005). Antimalarial efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and the combinations of amodiaquine + artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine + artesunate in Huambo and Bie provinces, central Angola. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jul; 99(7):485-92.
- **Haddad D., Snounou G., Mattei D., Enamorado I.G., Figueroa J., Stahl S., Berzins K.** (1999). Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60, 30-34.
- **Haywood M., Conway D.J., Weiss H., Metzger W., D'Alessandro U., Snounou G., Targett T., Greenwood B.** (1999). Reduction in the mean number of *Plasmodium falciparum* genotypes in Gambian children with the malaria vaccine SPf66. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93, Supl. 1 ; 65-68.
- **Henning L., Schellenberg D., Smith T., Henning D., Alonso P., Tanner M., Mshinda H., Beck H.P., Felger I.** (2003). A prospective study of *Plasmodium falciparum* multiplicity of infection and morbidity in Tanzanian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98, 687-694.
- **Hoffmann E.H.E., da Silveira L.A., Tonhosolo R., Pereira f :j :T., Ribeiro W.L., Tonon A.P., Kawamoto F., Ferreira M.U.** (2001). Geographical patterns of allelic diversity in the *Plasmodium falciparum* malaria-vaccine candidate, merozoite surface protein-2. *Ann Trop Med and Parasitology*, 95 (2); 117-132.

- **Holder,A.A., Blackman,M.J., Burghaus,P.A., Chappel,J.A., Ling,I.T., McCallum-Deighton,N., Shai,S.** (1992). A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87 Suppl 3, 37-42.
- **Holder,A.A. y Freeman,R.R.** (1984). Protective antigens of rodent and human bloodstage malaria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 307, 171-177.
- **Holder A.A., Lockyer M.J., Odink K.G., Sandhu J.S., Riveros-Moreno V., Nicholls S.C., Hillman Y., Davey L.S., Tizard M.L., Schwarz R.T.** (1985). Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature*, 317, 270-273.
- **Ittarat I., Asawamahsakda W., Meshnick S.R.** (1994). The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Exp. Parasitol.*, 79, 50-56.
- **Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, Ekala MT, Bouchier C, Esterre P, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O** (2005). Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*. Dec 3; 366 (9501): 1960-3.
- **Jones W.H.S.**, (1907) Malaria: a neglected factor in the History of Greece and Rome.
- **Jordan S., Jelinek T., Aida A. O., Peyerl-Hoffmann G., Heuschkel C., el Valy A. O., Christopher E.M.** (2001)Population structure of *Plasmodium falciparum* isolates during an epidemic in southern Mauritania. *Trop. Med. Int. Health*, 6, 761-766.
- **Kain, K.C., Craig, A.A., Ohrt, C.** (1996). Single-strand conformational polymorphism analysis differentiates *Plasmodium falciparum* treatment failures from re-infections. *Molecular Biochemical Parasitology* 79,167-175.
- **Kemp,D.J., Coppel,R.L., Anders,R.F.** (1987). Repetitive proteins and genes of malaria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41, 181-208.
- **Konate,L., Zwetyenga,J., Rogier,C., Bischoff,E., Fontenille,D., Tall,A., Spiegel,A., Trape,J.F., Mercereau-Puijalon,O.** (1999). Variation of *Plasmodium falciparum* msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93 Suppl 1, 21-28.
- **Kondrachine,A. y Trigg,P.I.** (1997). Control of malaria in the world. *Indian J. Malariol.*, 34, 92-110.
- **Koram KA, Abuaku B, Duah N, Quashie N.** (2005) Comparative efficacy of antimalarial drugs including ACTs in the treatment of uncomplicated malaria among children under 5 years in Ghana. *Acta Trop.* Sep; 95(3):194-203.
- **Kun,J.F., Schmidt-Ott,R.J., Lehman,L.G., Lell,B., Luckner,D., Greve,B., Matousek,P., y Kremsner,P.G.** (1998). Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambarene, Gabon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92, 110-114.
- **Laufer MK, Plowe CV.** (2004). Withdrawing antimalarial drugs: impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resist Updat.* Aug-Oct; 7(4-5):279-88.

- **Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalama FK, Takala SL, Taylor TE, Plowe CV.** (2006). Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med.* Nov 9; 355(19):1959-66.
- **Lee S.A., Yeka A., Msobya S.L., Dokomajilar C., Rosenthal P. J., Talisuna A., Dorsey G.** (2006). Complexity of *Plasmodium falciparum* infection and antimalarial drug efficacy at 7 sites in Uganda. *J Infect Dis.* 193: 1160-1163.
- **Looareesuwan,S., Buchachart,K., Wilairatana,P., Chalermrut,K., Rattanapong,Y., Amradee,S., Siripiphat,S., Chullawichit,S., Thimasana,K., Ittiverakul,M., Triampon,A., y Walsh,D.S.** (1997). Primaquine-tolerant vivax malaria in Thailand. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 91, 939-943.
- **Lyon,J.A., Geller,R.H., Haynes,J.D., Chulay,J.D., y Weber,J.L.** (1986). Epitope map and processing scheme for the 195,000-dalton surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum* merozoites deduced from cloned overlapping segments of the gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 83, 2989-2993.
- **Magesa SM, Mdira KY, Babiker H.A., Alifraqngis M., Färnert A, Simonsen PE, Bygbjerg IC, Walliker D., Jakobsen P.** (2002).Diversity of *Plasmodium falciparum* clones infecting children living in a holoendemic area in northeastern Tanzania. *Acta Tropica.*; 84:83-92.
- **Magesa SM, Mdira KY, Färnert A, Simonsen PE, Bygbjerg IC, Jakobsen P.** (2001).Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from re-infections by using polymerase chain reaction genotyping in a holoendemic area in northeastern Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001;65:477-483.
- **Maguire J.D., Sumawinata I.W., Masbar S., y col.** (2002). Chloroquine-resistant *Plasmodium malariae* in South Sumatra, Indonesia. *Lancet*: 360:58-60
- **Maitland K., Kyes S., Williams T.N., Newbold C.I.** (2000). Genetic restriction os *Plasmodium falciparum* in an area of stable transmission: an example of island evolution? *Parasitology*, 120;335-343.
- **Marshall,V.M., Anthony,R.L., Bangs,M.J., Purnomo, Anders,R.F., Coppel,R.L.** (1994). Allelic variants of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 (MSA-2) in a geographically restricted area of Irian Jaya. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 63, 13-21.
- **Marshall,V.M. y Coppel,R.L.** (1993). Antigenic typing of field isolates of *Plasmodium* by DNA techniques. *Methods Mol. Biol.*, 21, 223-248.
- **McBride,J.S. y Heidrich,H.G.** (1987). Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 23, 71-84.
- **McBride,J.S., Newbold,C.I., Anand,R.** (1985). Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Exp. Med.*, 161, 160-180.
- **Menard D, Madji N, Manirakiza A, Djalle D, Koula MR, Talarmin A.** (2005). Efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulfadoxine-pyrimethamine, chloroquine-sulfadoxine-pyrimethamine combination, and amodiaquine-sulfadoxine-pyrimethamine combination in Central African children with noncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg.* May; 72(5):581-5.

- **Miller,L.H.** (1994). Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 91, 2415-2419.
- **Mockenhaupt,F.P., May,J., Bienzle,U., y Meyer,C.G.** (1997). [Drug-resistant malaria]. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 122, 1293-1297.
- **Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Eggelte TA, Agana-Nsiire P, Stollberg K, Mathieu A, Markert M, Otchwemah RN, Bienzle U.** (2005). Chloroquine-treatment failure in northern Ghana: roles of pfprt T76 and pfmdr1 Y86. *Ann Trop Med Parasitol*. Dec; 99(8):723-32.
- **Molineaux,L.** (1985). The pros and cons of modelling malaria transmission. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79, 743-747.
- **Mubyazi GM, Gonzalez-Block MA.** (2005). Research influence on antimalarial drug policy change in Tanzania: case study of replacing chloroquine with sulfadoxine-pyrimethamine as the first-line drug. *Malar J*. Oct 20; 4:51.
- **Murphy,G.S., Basri,H., Purnomo, Andersen,E.M., Bangs,M.J., Mount,D.L., Gorden,J., Lal,A.A., Purwokusumo,A.R., y Harjosuwarno,S.** (1993). Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. *Lancet*, 341, 96-100.
- **Mutabingwa,T.K., Maxwell,C.A., Sia,I.G., Msuya,F.H., Mkongewa,S., Vannithone,S., Curtis,J., y Curtis,C.F.** (2001). A trial of proguanil-dapsone in comparison with sulfadoxine-pyrimethamine for the clearance of *Plasmodium falciparum* infections in Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95, 433-438.
- **Ntoumi,F., Contamin,H., Rogier,C., Bonnefoy,S., Trape,J.F., y Mercereau-Puijalon,O.** (1995). Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections.. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 52, 81-88.
- **Paul,R.E., Hackford,I., Brockman,A., Muller-Graf,C., Price,R., Luxemburger,C., White,N.J., Nosten,F., y Day,K.P.** (1998). Transmission intensity and *Plasmodium falciparum* diversity on the northwestern border of Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58, 195-203.
- **Paul,R.E., Packer,M.J., Walmsley,M., Lagog,M., Ranford-Cartwright,L.C., Paru,R., y Day,K.P.** (1995). Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea. *Science*, 269, 1709-1711.
- **Peyerl-Hoffman G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, von Sonnenburg F.** (2001) Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda. *Trop Med Hyg and Int. Heath.*; volumen 6 (8): 607-613.
- **Plowe,C.V., Cortese,J.F., Djimde,A., Nwanyanwu,O.C., Watkins,W.M., Winstanley,P.A., Estrada-Franco,J.G., Mollinedo,R.E., Avila,J.C., Cespedes,J.L., Carter,D., y Doumbo,O.K.** (1997a). Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J. Infect. Dis.*, 176, 1590-1596.
- **Plowe CV, Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DS, Mukadam RA, Chimpeni P, Molyneux ME, Taylor TE.** (2004) Sustained clinical efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated

- falciparum malaria in Malawi after 10 years as first line treatment: five year prospective study. *BMJ*. Mar 6; 328(7439):545.
- **Ramasamy,R.** (1987). Studies on glycoproteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*--lectin binding properties and the possible carbohydrate-protein linkage. *Immunol. Cell Biol.*, 65 (Pt 2), 147-152.
 - **Ranford-Cartwright,L.C., Balfe,P., Carter,R., y Walliker,D.** (1993). Frequency of cross-fertilization in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 107 (Pt 1), 11-18.
 - **Ranford-Cartwright LC, Taylor J, Umasunthar T, Taylor LH, Babiker HA, Lell B, Schmith-Ott JR, Lehman LG, Walliker D, Kremsner PG.** (1997). Molecular analysis of recrudescence parasites in a *Plasmodium falciparum* drug efficacy trial in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 91: 719-724.
 - **Ranjit M.R., Das A., Das B.P., Das B.N., Dash B.P., Chhotray G.P.** (2004). Distribution of *Plasmodium falciparum* genotypes in clinically mild and severe malaria cases in Orissa, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 99: 389-395.
 - **Rathod,P.K., Leffers,N.P., Young,R.D.** (1992). Molecular targets of 5-fluoroorotate in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 704-711.
 - **Robert,F., Ntoumi,F., Angel,G., Candito,D., Rogier,C., Fandeur,T., Sarthou,J.L., Mercereau-Puijalon,O.** (1996). Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90, 704-711.
 - **Roche J, Ayecaba S, Amela C, Alvar J, Benito A.** (1996). Epidemiological characteristics of malaria in Equatorial Guinea. *Research and Reviews in Parasitology*; 2-3: 99-104.
 - **Roche J., Guerra-Neira A., Raso J., Benito A.** (2003). Surveillance of in vivo resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarials from 1991 to 1999 in Malabo (Equatorial Guinea). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* May; 68:598-601.
 - **Rojanawatsirivet C, Congpuong K, Vijaykadga S, Thongphua S, Thongsri K, Bangchang KN, Wilairatana P, Wernsdorfer WH.** (2004). Declining mefloquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* along the Thai-Myanmar border. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. Sep; 35(3):560-5.
 - **Rosario,V.** (1981). Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*, 212, 1037-1038.
 - **Rubio, J.M., Benito, A., Berzosa, P..J., Roche, J., Puente, S., Subirats, M., Lopez-Velez, R., García, L. Alvar, J.** (1999). Usefulness of Seminested Multiplex PCR in Surveillance of Imported Malaria in Spain. *Journal Clinical Microbiology* 37, 3260-3264.
 - **Rubio, J.M., Benito, A., Roche, J., Berzosa, P.J., Garcia, M.L., Micó, M., Edú, M. and Alvar J.** (1999). Semi-nested multiplex PCR for detection of human malaria parasites, and evidence of *P. vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am. J. Tro, Med. Hyg.*, 60 (2): 183-187.
 - **Sallenave-Sales,S., Daubersies,P., Mercereau-Puijalon,O., Rahimalala,L., Contamin,H., Druilhe,P., Daniel-Ribeiro,C.T., Ferreira-da-Cruz,M.F.** (2000). *Plasmodium falciparum*: a comparative analysis

of the genetic diversity in malaria-mesoendemic areas of Brazil and Madagascar. *Parasitol. Res.*, 86, 692-698.

- **Schleiermacher D., Rogier C., Spiegel A., Tali A., Trape J.F., Mercereau-Puijalon, O.** (2001). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 64 (5,6): 303-309.
- **Sherman, I.W.** (1979). Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites). *Microbiol. Rev.*, 43, 453-495.
- **Silva N.S., Silveira L. A., Machado R.L.D., Pova M.M., Ferreira M.U.** (2000). Temporal and spatial distribution of the variants of merozoite surface protein-1 in *Plasmodium falciparum* populations in Brazil. *Ann Trop Med and Parasitology* 94 (7) ; 675-688.
- **Smith, T., Beck, H.P., Kitua, A., Mwankusye, S., Felger, I., Fraser-Hurt, N., Irion, A., Alonso, P., Teuscher, T., y Tanner, M.** (1999a). Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93 Suppl 1, 15-20.
- **Smith T., Felger I., Kitua A., Tanner M., y Beck H.P.** (1999b). Dynamics of multiple *Plasmodium falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93 Suppl 1, 35-39.
- **Smith T., Felger I., Tanner M., y Beck H.P.** (1999c). Premunition in *Plasmodium falciparum* infections: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93 Suppl 1, 59-64.
- **Snounou, G., Zhu, X., Siripoon, N., Jarra, W., Thaithong, S., Brown, K.N., y Viriyakosol, S.** (1999). Biased distribution of msp1 and msp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93, 369-374.
- **Su, X., y Wellems, T.E.** (1996). Toward a high resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics*, 33, 430-444.
- **Tanabe, K., Mackay, M., Goman, M., y Scaife, J.G.** (1987). Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.*, 195, 273-287.
- **Thaithong, S., Beale, G.H., Chutmongkonkul, M.** (1983). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to five drugs: an in vitro study of isolates mainly from Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 228-231.
- **Van de Peer, Y., de Wachter, R.** (1993). TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Computer Application Biosciences* 9, 177-182.
- **Verdrager, J.** (1986). Epidemiology of the emergence and spread of drug-resistant falciparum malaria in South-East Asia and Australasia. *J. Trop. Med. Hyg.*, 89, 277-289.
- **Verdrager, J.** (1995). Localized permanent epidemics: the genesis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 26, 23-28.
- **Viriyakosol s, Siripoon N., Petcharapirat C.** (1995). Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bulletin Of the World Health Organization*, 73, 85-95

- **Walliker,D., Quakyi,I.A., Wellems,T.E., McCutchan,T.F., Szarfman,A., London,W.T., Corcoran,L.M., Burkot,T.R., y Carter,R.** (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 236, 1661-1666.
- **Watkins,W.M., Mberu,E.K., Winstanley,P.A., y Plowe,C.V.** (1999). More on 'the efficacy of antifolate antimalarial combinations in Africa. *Parasitol. Today*, 15, 131-132.
- **Walsh P.S., Metzger DA, Higuchi R.** (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*;10(4):506-13.
- **Watkins,W.M. y Mosobo,M.** (1993). Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimethamine-sulfadoxine: selective pressure for resistance is a function of long elimination half-life. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87, 75-78.
- **Wellems,T.E., Panton,L.J., Gluzman,I.Y., do,R., V, Gwadz,R.W., Walker-Jonah,A., y Krogstad,D.J.** (1990). Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*, 345, 253-255.
- **Wernsdorfer,W.H. y Payne,D.** (1991). The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.*, 50, 95-121.
- **White,N.J.** (1997). Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 1413-1422.
- **World Health Organisation** (1996). Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated falciparum malaria in areas with intense transmission. WHO/MAL/96.1077:32pp.
- **World Health Organization** (2000). WHO Expert Comitee on Malaria. Geneva.
- **World Health Organization** (2001). Combinación terapéutica de medicamentos antipalúdicos.
- **World Health Organization** (2001). The use of antimalarial drug.
- **World Health Organization** (2006). Guidelines for treatment of malaria.
- **Zakeri S., Bereczky S., Naimi P., Gil J.P., Djadid N.D., Färnet A., Snounou G., Björkman A.** (2005). Multiple genotypes of the merozoite surface proteins 1 and 2 in *Plasmodium falciparum* infections in a hyperendemic area in Iran. *Trop Med and Int. Heath.*; volumen 10 (10): 1060-1064.
- **Zwetyenga,J., Rogier,C., Tall,A., Fontenille,D., Snounou,G., Trape,J.F. y Mercereau-Puijalon,O.** (1998). No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59, 726-735.
- **Zwetyenga J., Rogier C., Spiegel A., Fontenille D., Trape J.F., Mercereau-Puijalon O.** (1999). A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during the dry season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93, 375-380.